

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI  
KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**Termální analýza interakcí epidermálních  
lipidů II**

**Thermal analysis of interaction of epidermal  
lipids II**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2008

Naděžda Vrbatová

## **Abstrakt**

Termální analýza interakcí epidermálních lipidů II  
Naděžda Vrbatová, diplomová práce, červen 2008

Tato práce je zaměřena na hodnocení interakcí kožních lipidů pomocí diferenční skanovací kalorimetrie, řeší úsek týkající se přítomnosti vody v hodnocených vzorcích. Obsah vlhkosti rohové vrstvy je velmi různorodý. Závisí na vazebné schopnosti stratum corneum, zejména podmíněné lipidy.

Cílem je zjistit fázové přechody vody a jejich porovnání u dvou typů kelímků. Je zaměřena dále na to, jaké množství vlhkosti je na sebe schopna navázat epidermis a stratum corneum, i na zjištění kalorimetrických charakteristik tris pufru a jejich porovnání s vodou a vlivu tris pufru na kalorimetrické charakteristiky složek lipidických membrán. Je zde také uvedeno kalorimetrické hodnocení emulzní soustavy (tvořené z cetylalkoholu a bílého vosku).

## **Abstract**

Thermal analysis of interactions of epidermal lipids II  
Naděžda Vrbatová, degree work, June 2008

This work targets the assessment of interactions of epidermal lipids through the use of differential scanning calorimetry. It is trying to find a solution to the section relating to water existence in assessed samples. The moisture content of corner layer is very diverse. It depends on the bonding ability of stratum corneum, conditional especially on the lipids.

The aim of this work is to detect phase conversions of water and their comparing with two types of crucibles. It is also focused on the question of moisture quantity that are epidermis and stratum corneum able to bond to each other. This work shows calorimetry characteristics of tris buffer and their comparing with water as well as the impact of tris buffer to calorimetry characteristics of lipidic membrane components. Calorimetry assessment of the emulsive systém (made up of cetylalcohol and white wax) is introduced here, too.

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Marii Musilové, CSc., za odborné vedení, všestrannou pomoc a čas, který mi věnovala při vypracování mé diplomové práce. Poděkovat bych chtěla také paní Lence Svobodové za pomoc s experimentální částí.

# Obsah

1 ÚVOD .....	5
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1 Složení kůže .....	8
2.2 Funkce kůže .....	10
2.3 Stratum corneum .....	13
2.4 Voda .....	14
2.4.1 Vlastnosti a funkce vody .....	14
2.4.2 Fázový diagram vody .....	16
2.4.2.1 Rovnováha pevná látka – kapalina .....	17
2.4.2.2 Rovnováha plyn – kapalina a kritický bod .....	17
2.4.2.3 Superkritická oblast .....	18
2.4.2.4 Metastabilní stavy .....	18
2.4.3 Distribuce vody a s ní související morfologie lidského strata cornea (SC) na různých stupních hydratace .....	18
2.4.3.1 Studie zaměřená na přezkoumání interakcí vody .....	21
2.5 Hydratace kůže .....	26
2.5.1 Měření hydratace kůže .....	27
2.5.2 Přímé měření na principu kapacity .....	27
2.5.2.1 Podmínky měření .....	28
2.5.3 Přímé měření na principu vodivosti (konduktivity) .....	28
3 PRACOVNÍ ÚKOL .....	29
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31
4.1 Použité přístroje .....	32
4.2 Seznam použitých surovin .....	32
4.3 Pracovní postup .....	33
4.3.1 ÚKOL Č. 1 .....	33
4.3.1.1 Příprava vzorků .....	33
4.3.1.2 Vlastní měření .....	33
4.3.1.3 Způsob vyhodnocování .....	33
4.3.2 ÚKOL Č. 2 .....	34
4.3.2.1 Příprava vzorků .....	34
4.3.2.2 Vlastní měření .....	34
4.3.2.3 Způsob vyhodnocování .....	34
4.3.3 ÚKOL Č. 3 .....	35
4.3.3.1 Příprava epidermis .....	35
4.3.3.2 Provedení úkolu .....	35
4.3.3.3 Způsob vyhodnocování .....	35
4.3.4 ÚKOL Č. 4 .....	36
4.3.4.1 Příprava vzorků .....	36
4.3.4.2 Vlastní měření .....	36
4.3.4.3 Způsob vyhodnocování .....	36
5 VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....	37
5.1 Výsledky měření .....	38
5.1.1 ÚKOL Č. 1 .....	38
5.1.2 ÚKOL Č. 2 .....	45
5.1.3 ÚKOL Č. 3 .....	52
5.1.4 ÚKOL Č. 4 .....	66
6 DISKUZE .....	68
7 ZÁVĚR .....	74
8 LITERATURA .....	77

## **1 ÚVOD**

Tato práce patří do skupiny prací zaměřených na hodnocení interakcí kožních lipidů pomocí diferenční skanovací kalorimetrie (DSC). Jedná se o široce zaměřenou problematiku, z níž tato práce řeší úsek týkající se přítomnosti vody v hodnocených vzorcích.

Správný obsah vlhkosti rohové vrstvy může být velmi různý (hodnoty od 10 - 60 % obsahu vody). Závisí na vazebné schopnosti str. corneum, zejména podmíněné lipidy. Správně hydratovaná kůže vede k žádoucí, optimální elasticitě a omezuje projevy stárnutí. Tzv. stařecká kůže je tenká, suchá, drsná, se sklonem k záhybům a vráskám. Stav mohou zhoršit detergenty a nevhodná kosmetika. K problematice tedy přistupují i rozdíly podmíněné stářím, pohlavím a lokalizací.

Uplatňuje se ale ještě celá řada dalších vnějších a vnitřních faktorů. Především je to kožní dýchání, výměna vodní páry, produkce potu, teplota, vlhkost vzduchu, kosmetika a farmaceutické preparáty. Z těchto důvodů se neuvádějí normální standardní hodnoty vlhkosti kůže. Přesto určování hydratace má značný význam hlavně v průběžném sledování u téhož jedince a ve stejné lokalitě. Informace o významu vody a jejím obsahu v kůži se stále rozšiřují a zpřesňují. Její množství je samozřejmě nejvyšší v nižších vrstvách epidermis, velmi nízké, přesto významné, je ve str. corneum. Voda se šíří od živých částí epidermis k povrchu při neporušené bariéře. Dochází tak k fyziologické transepidermální ztrátě vody.

Měření hydratace kůže in vivo patří k základním neinvazivním postupům, které jsou využívány ve fyziologických i patologických šetřeních, při diagnostice onemocnění a zejména při testování účinnosti kosmetických a dermatologických prostředků. Objektivního vyhodnocení hydratace je možné docílit přímým i nepřímým přístupem, měřením pomocí řady fyzikálních metod, využívajících elektrické i neelektrické způsoby, které se mění vlivem hydratace kůže. Zmíněné funkce a vlastnosti kůže lze posoudit přímým měřením kapacity, impedance (odporu) a vodivosti (konduktivity) a dále nepřímo např. měřením elasticity, pomocí kolorimetrie a gravimetrie, přičemž se jednotlivá měření vzájemně doplňují. V běžné praxi se používá zejména měření kapacity a elektrického odporu.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Složení kůže<sup>1)</sup>

Kůže je rozsáhlý plošný orgán pokrývající povrch organismu, tím tvoří bariéru organismu vůči okolí. Představuje účinnou ochranu vůči fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým noxám z okolí. Uspořádáním svého cévního řečiště a svými žlázami a dále tím, že sama je špatný vodič tepla, představuje kůže termoregulační systém, který ovládá tepelné ztráty do okolí pomocí činnosti potních žláz a pomocí změn průtoku krve ve svém cévním řečišti.

Kůže dospělého člověka dosahuje plochy téměř  $2\text{m}^2$  (průměrně  $1,6 - 1,8\text{m}^2$ ). Její tloušťka se pohybuje od 0,5 mm do 4 mm.

Kůže má dvě hlavní vrstvy: 1) epidermis – pokožka  
2) dermis, corium – škára

Epidermis je povrchová vrstva tvořená epitelem ektodermového původu; je to vrstevnatý dlaždicový epitel, v povrchových vrstvách zrohovatělý. Základními buňkami jsou keratinocyty, obsahuje ale i další buňky: melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Vrstevnatý epitel, jehož buňky od lamina basalis do určité výše tvoří stratum germinativum, což je vrstva zárodečná, jejíž bazální buňky se mitoticky množí, se směrem k povrchu diferencuje a mění se ve stratum corneum – rohovou vrstvu, která je nositelem bariérové funkce kůže. K pokožce patří i útvary, které z ní vznikají – deriváty epidermis – chlupy, nehty a kožní žlázy.

Buňky epidermis vytvářejí vrstvy. Stratum germinativum je vrstva zárodečná; rozlišují se v ní další dvě vrstvy: *stratum basale (cylindricum)* – jedna vrstva vyšších buněk při bazální membráně, v níž jedině probíhá buněčné dělení a vznik nových buněk; *stratum spinosum* – navazuje na stratum basale; buňky se v něm ve 2 – 5 vrstvách směrem k povrchu oplošťují do tvaru, který je na kolmém řezu kopinatý nebo polyedrický.

Dalšími vrstvami epidermis směrem k povrchu jsou: stratum granulosum, obsahující 1 – 3 vrstvy buněk, kde se v buňkách začínají vytvářet zrna keratohyalinu (což je prekurzor keratinu); buňky postupují k povrchu, diferencují se a pak podléhají buněčné smrti; po ztrátě jádra se mění ve stratum lucidum, což je tenká vrstva, nápadnější v tlustší epidermis na dlani nebo na chodidle; buňky této vrstvy obsahují eleidin (což je další prekurzor keratinu);



stratum lucidum přechází přesnou hranicí ve stratum corneum; tato vrstva je složena z plně zrohovatělých buněk; jsou to bezjaderné keratinocyty. Nejpovrchovější vrstva těchto bezjaderných keratinocytů se průběžně rozděluje v jednotlivé zbytky buněk (stratum disjunctum) a ty se pak postupně odlučují a odpadávají.

Dermis je vazivo, na jehož povrchu je epidermis; vývojově pochází z mezodermy; je to fibroelastické kolagenní vazivo se dvěma vrstvami: *stratum papillare* – povrchová vrstva – přiléhá k epidermis, proti které vybíhá ve vyvýšené papily; *stratum reticulare* – hlubší, hustší vrstva – dává kůži mechanickou pevnost.

Dermis je vazivovými septy připoutána k další vrstvě vaziva; je to tela subcutanea – podkožní vazivo – které odděluje kůži od povrchové facie nebo od periostu.

Dermis je složená z vaziva se zvlněnými kolagenními a elastickými vlákny; vlákna jsou spojena ve snopce, které jsou plstovitě propletené. Tloušťka škáry činí 0,5 – 2,5 mm. Vrstvy škáry jsou dvě: *stratum papillare* – povrchová vrstva – obsahuje kromě sítí vláken i větší množství vazivových buněk a je protkaná sítí kapilár, které zasahují do papil koria; *stratum reticulare* – hlubší vrstva – obsahuje méně buněk a husté svazky kolagenních fibril, méně fibril elastických; vlnitý průběh snopců kolagenního vaziva umožňuje tažnost kůže; elastické fibrily pak vracejí stav zpět, poté co tah povolil.

**Tela subcutanea – podkožní vazivo** spojuje kůži s povrchovou facií nebo s periostem; obsahuje četné hustší vazivové pruhy – retinacula cutis, jdoucí k faciím a k periostu. V místech těchto spojení není kůže posunlivá a nemůže se tam tvořit tak vysoký tukový polštář jako v okolí.

Podkožní tukové vazivo je jednak skladištěm zásobních látek, jednak má ochrannou a izolační funkci při termoregulaci a konečně na některých místech má i význam mechanický. Tato mechanicky závažná nahromadění tuku nemizí ani při dlouhém hladovění – jde o tzv. stavební tuk. Tukový polštář bývá nejsilnější na břiše, v hýžděové krajině a v proximální části stehen, naopak zcela chybí v podkoží očních víček, na ušních boltcích, na hřbetu nosu. V místech vystavených mechanickému namáhání (většinou tlaku a tření) se v podkožním vazivu vytvářejí bursae synoviales subcutaneae – podkožní tíhové váčky

– vyplněné tekutinou podobnou synoviální tekutině, která tlumí mechanické namáhání.

## **2.2 Funkce kůže<sup>2)</sup>**

Funkce kůže spočívají především v ochraně vnitřního prostředí před nepříznivými změnami prostředí zevního.

### **1) *Ochranné funkce kůže***

Kůže odolává nebo alespoň minimalizuje škodlivé účinky mechanických, osmotických, chemických, tepelných a světelných vlivů prostředí.

### **2) *Bariéra proti infekci***

Kůže tvoří bariéru proti průniku mikroorganismů. Prostor povrchu kůže je poměrně suché a kyselé, a proto nepříznivé pro jejich existenci a hlavně jejich rozmnožování. Imunologická ochrana spočívá ve funkci Langerhansových buněk, které představují nejperifernější část imunitního systému. Jsou uloženy ve stratum spinosum epidermis. Jejich funkce spočívá v rozpoznání antigenu, jeho zpracování a prezentace. Mají receptory pro protilátky (IgG) a pro komplement.

### **3) *Termoregulace***

Kůže má rozhodující význam v termoregulaci. Usměrnjuje a reguluje prostřednictvím speciálních neurovaskulárních mechanismů výměnu tepla mezi organismem a prostředím. Sama kůže s vrstvou podkožního tuku je důležitý tepelný izolátor. Hustota cévního zásobení kůže vysoce převyšuje její požadavky na dodávku kyslíku a živin a změny v průtoku krve kůže jsou aktivovány změnami teploty prostředí i vnitřní teploty těla. Zvláštností kožní cirkulace jsou z tohoto hlediska arteriovenózní anastomózy, které zkratují tok krve z arteriál do venul, tím obcházejí kapilární řečiště a umožňují rychlé změny prokrvení. Nejvíce AV-anastomóz je na koncích prstů ruky a dlaních, na prstech a ploskách nohou, uších, nosu a rtech. Druhým kožním mechanismem sloužícím termoregulaci je odvádění přebytečného tepla odpařováním čili sekrecí potu. (Odpařování vody s povrchu těla se netýká jen potu; patří sem i perspiratio insensibilis, tj. stálé přímé odpařování vody, která proniká z intersticiální tekutiny na povrch kůže a zvlhčuje ji.) V lidské kůži jsou dva typy potních žláz:

- apokrinní, lokalizované převážně v axile a perigenitální krajině a adrenergně inervované, neslouží termoregulaci. Produkují chemické pachové signály související se základními biologickými funkcemi,
- ekrinní jednoduché tubulární, distribuované po celém těle, jsou právě potní žlázy a secernují pot. Stimulace potních žláz cholinergními sympatickými vlákny je provázena dilatací kožních odporových cév (pot obsahuje vazodilatačně působící bradykinin).

#### **4) Kůže jako receptorový orgán**

Kůže obsahuje velké množství receptorů somato-senzorického systému, které umožňují nepřetržitou komunikaci se zevním prostředím (dotykové a tlakové receptory, termoreceptory, receptory pro bolest).

#### **5) Resorpční a exkreční činnost kůže**

Resorpce se díky vstřebatelnosti především liposolubilních látek využívá při aplikaci léčebných mastí. Exkreční funkci obstarávají zčásti potní žlázy, zčásti žlázy mazové. Mazové žlázy jsou vázány na vlasové folikuly a ústí do nich. Jsou poměrně rovnoměrně rozloženy po celém těle. Sekrecí kožního mazu se na povrch dostávají lipidy. Tukový maz chrání kůži před účinky vlhka a před vysycháním a zvláčňuje vlasy. Má také baktericidní účinky. Různé triacylglyceroly mazu jsou štěpeny esterázami rezidentních bakterií kůže a vzniklé volné mastné kyseliny ovlivňují fyziologické kyselé prostředí kožního povrchu. Produkce mazu je pod komplexní hormonální kontrolou: androgeny působí stimulačně, estrogeny inhibičně.

#### **6) Kůže jako prostředek sociální komunikace**

Kůže je nositelkou morfologických znaků individuality a významně se podílí na sociální komunikaci. Fyziognomie, mimické výrazové prostředky a vyjadřování emocí mají mimořádně důležitou sdělovací úlohu.

#### **7) Barva kůže**

Z hlediska funkcí kůže je významná i její barva. Epidermis obsahuje melanocyty. Nejvíce melanocytů je v kůži osvětlených oblastí (obličej, hřbety rukou), mamil a zevního genitálu. V melanocytech se tvoří polymerizací tyroxinu černo-hnědý (nebo též žluto-červený) pigment melanin. Syntéza melaninu probíhá ve specifických organelách melanocytů – melanosomech, které po dozrání putují ve výběžcích melanocytů a jsou tak transportovány do sousedních keratinocytů. Barva kůže pak závisí na počtu, velikosti

a distribuci melanosomů v keratinocytech. Velice důležitou funkcí melaninu je chránit hluboké vrstvy epidermis před poškozením chromosomů UV zářením. Proto se melanosomy v keratinocytech shromažďují okolo buněčného jádra. Kromě melaninů jsou v kůži i karoteny.

### **8) Regenerace kůže**

Epidermální vrstva kůže patří ke tkáním, které trpí přímým a často i poškozujícím vlivem zevního prostředí. Její zralé povrchové buňky se trvale odírají a olupují a jsou rychle nahrazovány proliferací a diferenciací buněk z vnitřních vrstev. Obnovování buněk závisí na kmenových buňkách. Epidermální kmenové buňky nejsou diferencované a jsou obtížně identifikovatelné. Jsou však determinované a mají charakter unipotentních buněk, které dávají vznik jen jednomu typu terminální buňky. Mají schopnost se neomezeně dělit a poskytují jednak potomstvo, které se diferencuje, a další, které zůstává kmenovými buňkami. Mají schopnost sebeobnovy, takže jich neubývá a jsou uloženy v nejhlubší vrstvě epidermis (bazální buňky). Odtud cestují diferencující se dceřiné buňky kolmo vzhůru a přechodně se stanou součástí metabolicky aktivní vrstvy, v níž nabývají velmi charakteristického vzhledu (stratum spinosum). Tak, jak buňky cestují k povrchu, syntetizují keratin (keratinocyty), který je přítomen ve všech vrstvách epidermis. Pro každý vývojový stupeň jsou to postupně různé typy keratinů. Buňky ve stratum spinosum se oplošťují, pozbývají jádra i intracelulárních organel a postupně se změní na ploché „šupiny“, které neobsahují prakticky nic jiného než keratin; tyto šupinovité buňky, stlačené a hustě uspořádané, tvoří povrchovou vrstvu epidermis, z níž se opět odírají a olupují.

### **9) Sekrece cytokinů v kůži**

V normální kůži nezbytně existuje rovnováha mezi počtem keratinocytů produkovaných v bazální buněčné vrstvě a množstvím šupin deskvamovaných z kožního povrchu. Taková stabilní epidermis je výsledkem rovnováhy mezi stimulačními a inhibičními růstovými faktory – cytokiny – v kůži. Cytokiny jsou produkovány keratinocyty. Představují 3 skupiny: růstové faktory, interleukiny a CSF (kolonie stimulující faktory). Většina faktorů je stimulačních; inhibiční faktory produkované keratinocyty autokrinně tlumí jejich vlastní růst. Řada cytokinů rovněž zprostředkovává v kůži imunitní reakce. Keratinocyty odpovídají

i na cytokiny produkované jinými buňkami. Cytokinů zejména přibývá v zanícené nebo poraněné kůži. Při poškození keratinocytů UV zářením, popálením, mechanickým poraněním, bakteriální nebo virovou infekcí se tyto buňky aktivují a uvolňují mnoho cytokinů. Ty se vážou na receptory různých zánětlivých buněk i keratinocytů samotných, což vede k produkci dalších cytokinů, např. i z monocytů/mikrofágů. Buněčné interakce podmíněné účinky cytokinů směřují k procesům zánětu, buněčné migrace, depozice nového materiálu, jeho zrání a nakonec zahojení poranění.

### **10) Význam kůže pro příjem vitaminu D**

Kůže je u člověka hlavním zdrojem vitaminu D. Ve stratum granulosum kůže je přítomen jeho prekurzor, 7-dehydrocholesterol, který se účinkem UV paprsků slunečního světla přeměňuje na cholekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>). Ten se v játrech hydroxyluje na 25-OH-D<sub>3</sub> a tento prekurzor se další hydroxylací v buňkách proximálních tubulů ledvin mění na 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, zvaný též kalcitriol, který se vylučuje do krve. Hlavními stimulačními podněty pro tvorbu kalcitriolu v ledvinách jsou hypokalcemie a hypofosfatemie. Kalcitriol zvyšuje plazmatickou hladinu vápníku a fosfátů tím, že zvyšuje jejich resorpci ve střevě.

## **2.3 Stratum corneum<sup>3)</sup>**

Stratum corneum (SC) je nejdůležitější vrstva epidermis, je to její nejzevnější vrstva. Stratum corneum zajišťuje většinu kožních ochranných funkcí. Má tloušťku 10 μm až 20 μm. Na příčném řezu lze rozlišit tři oddělené vrstvy epidermis, zdola nahoru je to: bazální vrstva, spinózní vrstva a granulární vrstva. Stratum corneum je umístěno nad granulární vrstvou. Ačkoli jsou ve stratum corneum přítomny enzymy, mnoho vědců na ně pohlíží jako na mrtvou tkáň, protože SC nemůže obnovit samo sebe.

Buňky SC – korneocyty – jsou ploché, podlouhlé a mají hexagonální tvar. Každá má průměr asi 40 μm a tloušťku asi 25 μm, i když mohou být desetkrát silnější na dlaních a chodidlech. Korneocyty obsahují v největším množství nerozpustný keratin.

SC podléhá neustálému procesu deskvamace. Obvyklá perioda přeměny je dva až tři týdny, ale v určitých situacích, např. při lupénce, může přeměna

trvat dva až čtyři dny. Během období rychlých změn, např. při lupénce nebo jiných kožních defektech, selhává funkce bariéry a penetrace je velmi usnadněná. Největší význam pro penetraci mají lipidy, které představují bariéru pro pohyb molekul skrz kůži. Lipidy SC obsahují přibližně 39% derivátů cholesterolu, 41% ceramidů, 9% mastných kyselin, 11% triglyceridů a dalších. Tyto složky jsou součástí buněčné membrány spolu s ceramidy, fosfolipidy a cholesterol sulfátem.

## **2.4 Voda**

### **2.4.1 Vlastnosti a funkce vody<sup>4)</sup>**

Voda proniká všemi částmi každé buňky, tkáně a pletiva a je základním prostředím, v němž se odehrává veškeré dění v buňce. Je výtečným rozpouštědlem polárních a iontových sloučenin, aktivně se zúčastňuje řady hydrolytických a hydratačních reakcí a acidobasických dějů probíhajících v rámci metabolismu a interakcemi s biomakromolekulami a biomembránami určuje jejich tvar.

Biologické funkce vody jsou podmíněny jejími vlastnostmi fyzikálními (mnohem vyšší body tání a varu, než odpovídá její nízké molekulové hmotnosti, a vysoká relativní permitivita) a chemickými (schopnost tvorby vodíkových vazeb, vyvolání hydrofobního efektu a schopnost autoionisace).

Nerovnoměrné rozdělení elektronů v symetrické molekule vody vede ke vzniku polaritě vazeb O-H. Tyto vazby pak působí jako permanentní dipoly, které se vzájemně přitahují, a interakce mezi slabě pozitivním atomem vodíku jedné molekuly a slabě negativním atomem kyslíku jiné molekuly vody vyvolá interakci dipol-dipol, nazývanou vodíková vazba.

Voda je všudypřítomným rozpouštědlem v biologických systémech: většina organických a anorganických složek buněk je rozpuštěná ve vodě. U mnohobuněčných organismů se vedle vody v buňkách vyskytuje voda i v tělních tekutinách, v nichž funguje hlavně jako transportér, umožňující rozvod rozpuštěných látek po organismu.

Ve vodě se rozpouštějí ionty a polární molekuly, protože vzájemná přitažlivost jejich kladných a záporných nábojů je menší než přitažlivost těchto

nábojů s molekulami vody. Ionty a polární molekuly proto vytvářejí orientovanou vrstvu molekul vody ve svém bezprostředním sousedství, přičemž buď snižují, nebo naopak zvyšují uspořádání molekul vody v nitru kapaliny, a ovlivňují tak jejich pohyblivost. Vrstva molekul vody v okolí polárních molekul bílkovin a nukleových kyselin udržuje v dispergovaném stavu i tyto obří molekuly za vzniku koloidního roztoku.

Uhlovodíky a jiné nepolární látky se ve vodě nerozpouštějí, protože interakce  $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  je silnější než interakce  $\text{H}_2\text{O}$ -nepolární látka. Molekuly vody proto „vytlačují“ molekuly nepolárních látek a tlačí je k sobě. Hovoříme o tzv. hydrofobním efektu a nepolární molekuly pak označujeme jako hydrofobní.

Voda vyvolává disociaci mnohých součástí buněk na ionty. Jejich vzájemné přiblížení vlivem elektrostatických interakcí umožňuje reakce mezi nimi, které by v bezvodém prostředí nemohly probíhat. Mnoho biochemických procesů pak závisí na koncentraci produktů autoionisace vody, protonů. Autoionisace vody a její účast v acidobasických reakcích je též zásadní pro fungování bílkovin a nukleových kyselin.

Důležitým buněčným „palivem“ jsou atomy vodíku. Mnohé z nich pocházejí z molekul vody, které vstupují do chemického dění v organismech v hydrolytických a hydratačních reakcích.

Koncentrace protonů má pro život zásadní význam. Většina procesů probíhá v organismech v blízkosti pH 7. Stálost hladiny protonů, potřebnou pro normální průběh biochemických reakcí i většiny fyziologických funkcí, zajišťuje řada systémů s pufrací kapacitou.

Kromě stálosti koncentrace protonů vyžaduje organismus i stálost koncentrace rozpuštěných látek. Membrána obalující buňky má semipermeabilní charakter, a je proto velmi citlivá na změny osmotického tlaku, vyvolané pronikáním vody do roztoku rozpuštěných látek.

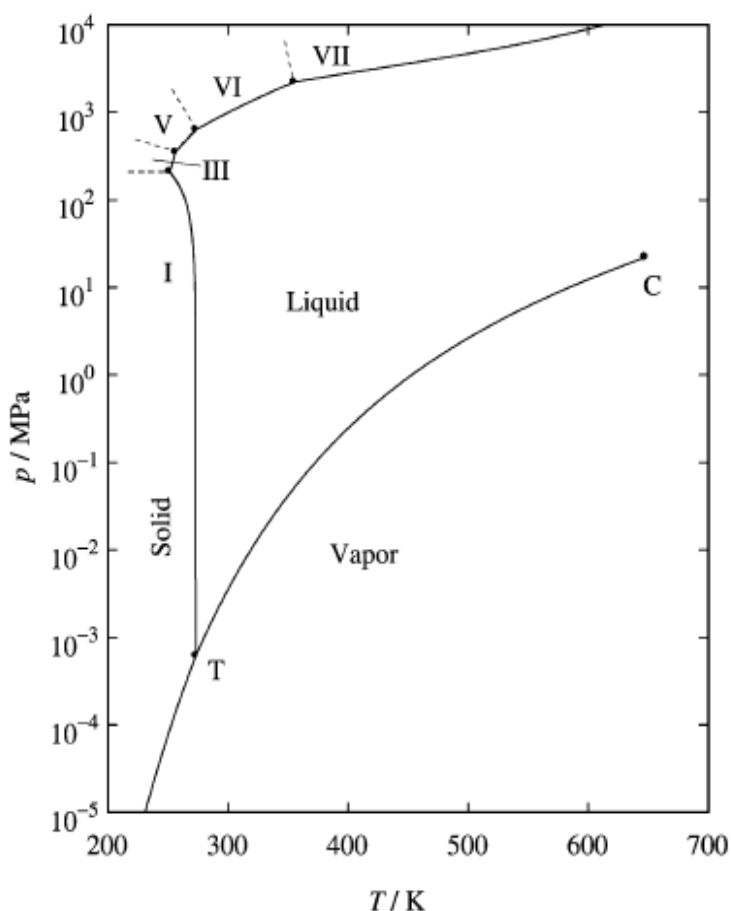
Roztoky se stejnou koncentrací rozpuštěných látek (a tedy i o stejném osmotickém tlaku), jako tekutiny organismu, nazýváme isotonické, roztoky s vyšším obsahem látek hypertonické a s nižším obsahem hypotonické.

Ponoříme – li buňku do hypertonického roztoku, proniká voda buněčnou membránou ven a buňka tím zmenšuje svůj objem. Tento děj se nazývá plasmolýza. V hypotonickém roztoku buňka naopak přijímá vodu z okolí,

a zvětšuje tak svůj objem. Může dojít až k prasknutí buněčné membrány. Tomuto jevu říkáme plasmoptýza.

Voda se také podílí na udržování konstantní teploty organismů. Umožňuje jí to její poměrně velká tepelná kapacita. Živí jedinci jsou schopni existovat v bioklimatických hranicích 0°C-50°C, známe však organismy, které žijí i v prostředích se stálou nižší nebo vyšší teplotou.

## 2.4.2 Fázový diagram vody



**Obr. 1** Fázový diagram vody (C ..... kritický bod, T ..... trojný bod)<sup>5)</sup>



### **2.4.2.1 Rovnováha pevná látka – kapalina**

Trojný bod je jedinečným předpokladem pro koexistenci pevné látky, kapaliny a plynu. To je bod (označený „T“) na obr. 1<sup>5)</sup>, kde se protínají tři křivky. Teplota trojného bodu obyčejné vody je přesně 273,16 K. Nejpřesnější měření tlaku vody v trojném bodě má hodnotu  $611,57 \pm 0,010 \text{ Pa}$ .<sup>5)</sup> Při tlaku nižším, než je tlak trojného bodu, může existovat v rovnováze pouze pevná fáze (led) a plynná fáze. Tlak páry (nazývaný též sublimační tlak) ledu v této oblasti byl změřený ve stejném rozsahu a může být také odvozený z dalších termodynamických údajů. Wagner a kol.<sup>6)</sup> použil pro jeho výpočet tento vzorec:  $\ln(p_{\text{subl}}/p_t) = a_1 \cdot (1 - \theta_t^{-1,5}) + a_2 \cdot (1 - \theta_t^{-1,25})$ , kde  $\theta_t = T/T_t$ ,  $T_t = 273,16 \text{ K}$ ,  $a_1 = -13,928169$ ,  $a_2 = 34,7078238$ . Při tlaku vyšším, než je tlak trojného bodu, koexistuje pevná fáze s kapalnou fází. Jak se zvyšuje tlak, hranice pevná látka – kapalina zpočátku směřuje k nižším teplotám. Tato záporně se svažující křivka tání je termodynamický důsledek skutečnosti, že led (jako led I, stabilní forma při nižších tlacích) má menší hustotu než kapalná voda. Při vyšších tlacích se ostatní formy ledu (s různými krystalovými strukturami, označené římskými číslicemi) staly stabilní, jak ukazuje obr. 1<sup>5)</sup>. Poněvadž tyto formy mají větší hustotu než při koexistenci s kapalnou vodou, spád křivky tání se stává pozitivní.<sup>6)</sup>

### **2.4.2.2 Rovnováha plyn – kapalina a kritický bod**

Nejdůležitější na fázovém diagramu (pro nejvíce účelů) je koexistence mezi párou a kapalinou, běžně známá jako křivka tlaku vodní páry. Tlak vodní páry stoupá s teplotou, dokud nedosáhne bodu, kde se kapalina (rozpínající se stoupající teplotou) a pára (stlačená při vyšším tlaku) stanou identické. Tato hranice křivky tlaku páry (označená „C“ na obr. 1<sup>5)</sup>) se nazývá kritický bod. Některé termodynamické vlastnosti (jako stlačitelnost při konstantní teplotě) se rozbíhají směrem k nekonečnu v kritickém bodu.<sup>7)</sup>

Tlak vodní páry při dané teplotě je nižší než tlak jiných látek (jako  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{NH}_3$ ), že by se mohlo očekávat, že se bude voda chovat podobně na základě sumárních vzorců. Toto je důsledek silné vodíkové vazby v kapalně vodě; tyto interakce zvyšují množství tepelné energie potřebné k přeměně molekul z kapaliny na páru.

### **2.4.2.3 Superkritická oblast**

Neexistuje jednotná definice tohoto termínu. Vždy se odkazuje na stav, kdy je teplota nad kritickou teplotou  $T_c$ . Někteří ji používají jako odkaz na určitý systém nad  $T_c$  bez ohledu na tlak, zatímco další omezují použití termínu pro oblast, kde obě teploty a tlaky jsou nad svými kritickými hodnotami. Při teplotách nad  $T_c$  je možný přechod z hustot podobných kapalině k hustotám podobných páře změnou tlaku bez přechodu skrz fázový přechod; toto má potenciální výhody pro určité separační procesy.

### **2.4.2.4 Metastabilní stavy**

Na obr. 1<sup>5)</sup> je zobrazena pouze rovnováha fází vody. U vody je možné, aby existovala po významnou časovou periodu ve stavech, kde není v termodynamické rovnováze. Takové stavy jsou označovány jako metastabilní. Dobře známý metastabilní stav je přehřátá kapalina, která může být získána zahříváním vody v nádobě s hladkým povrchem. Jestliže není kapalina narušena, může být přivedena k teplotě nad svou teplotu varu. Dokud nezačne var (proces známý jako nukleace), je kapalina v metastabilním stavu, který je fyzikálně nerozeznatelný od běžné kapaliny, až na to, že za daný dostatečný čas dosáhne svého rovnovážného stavu odpovídajícímu umístění ve vztahu k rovnováze fázové hranice. Podobně se může vytvořit podchlazená kapalina opatrným chlazením pod bod mrazu.

Pára může být také metastabilní; přesycená pára je jediná, která byla chlazená na teplotu, kdy by rovnovážný stav odpovídal kapalině při tlaku tohoto systému. Přesycená pára je důležitá v parních turbínách, kde časové stupnice expanzí mají tak malý rozsah, že v určitých bodech je pára přesycená, protože neměla čas kondenzovat.<sup>8)</sup>

### **2.4.3 Distribuce vody a s ní související morfologie lidského strata cornea (SC) na různých stupních hydratace**

Krok omezující rychlost difúze přes kůži je horní vrstva kůže, SC. SC je složeno z korneocytů zasazených v hydrofobních lipidových doménách. Většina těchto lipidů tvoří krystalické lamelární fáze. Korneocyty jsou vyplněné

zesítným měkkým keratinem. Nejvíce léčiv aplikovaných na kůži proniká přes oblasti mezibuněčných lamelárních lipidů. Toto bylo obzvláště ilustrováno na studii<sup>9)</sup>, která odhalila, že fluorescenční sondy jsou rozptýlené hlavně podél mezibuněčných postranních cest. V šedesátých letech bylo již ustanoveno, že lipidové domény v SC hrají důležitou roli ve funkci kožní bariéry<sup>10)</sup>. Kromě správného uspořádání lipidů je stupeň hydratace SC jedním z klíčových prvků pro funkce kožní bariéry. Úroveň hydratace je funkce vlhkosti prostředí hygroskopických vlastností SC. Hygroskopické vlastnosti SC jsou silně ovlivněné přítomností přirozených zvlhčujících faktorů. Například snížená hladina přirozených zvlhčujících faktorů<sup>11)</sup> je jedním z důvodů, proč je v suché kůži úroveň hydratace menší než v normální kůži. Úroveň hydratace kůže nejen nepříznivě ovlivňuje kožní bariéru, ale také nepříznivě ovlivňuje enzymatickou aktivitu v SC.<sup>12)</sup> Nedávno bylo stanoveno, že stupeň přirozené hydratace SC in vivo je kolem 30% - 50%<sup>13)</sup> z hmotnosti jeho sušiny. In vitro se stupeň hydratace SC může velice lišit. Když je SC zcela ponořeno do vody, zvyšuje SC hmotnost sušiny až na 300% - 400%. Voda je velmi účinný urychlovač přirozené penetrace, co se týká zvýšení toku jak hydrofilních, tak lipofilních substancí. Po absorpci 300% vody zůstane redukovaná kožní bariéra. Při nízkém stupni hydratace je SC křehké a slabé, ale jakmile dosáhne stupeň hydratace hodnoty kolem 10%-15%, SC se značně změkčí. Voda pravděpodobně vystupuje jako plastifikátor. Bylo zjištěno, že pouze pokud množství vody překračuje 20% - 30% hmotnosti sušiny SC, bude volná voda (mající stejné vlastnosti jako čistá voda) přítomná v kůži.<sup>14)</sup> Ačkoli stupeň hydratace je za normálních podmínek 30% - 50% hmotnosti sušiny,<sup>13)</sup> stupeň hydratace SC in vivo se může podstatně zvětšit okluzí<sup>15)</sup> nebo ve velmi vlhkém okolním prostředí.

Bylo provedeno několik studií týkajících se interakcí vody a lipidů SC. V jedné z prvních studií byl účinek vody na přechody lipidů studován diferenční termickou analýzou. Van Duzee<sup>16)</sup> zjistil mírné snížení teplot fázového přechodu lipidů, když se zvýšil obsah vody, ukazující, že voda nepříznivě ovlivňuje uspořádání kožních lipidů. Když ale obsah vody překročil 20%, další zvýšení obsahu vody nesnížilo teploty přechodů lipidů v SC.<sup>17)</sup>

V další studii byla použita Fourierova transformační infračervená spektroskopie pro zkoumání účinku vody na mobilitu lipidů SC.<sup>18)</sup> Tato studie

neodhalila téměř žádné změny v pohyblivosti lipidů, ale přímočarý vztah mezi transportem vody a pohyblivostí řetězce při zvýšených teplotách.<sup>19)</sup>

Naproti tomu studium elektronové rotační rezonance ukázalo mírné zvýšení pohyblivosti lipidů se stoupajícím obsahem vody.<sup>20)</sup> Bobtnání lamel lipidů v SC bylo rovněž studováno. Technika rentgenové difrakce neodhalila téměř žádné nabobtnání lamel,<sup>21)</sup> když se zvýšila hydratace. Navíc nebyly pozorovány změny v bočním uspořádání lipidů.<sup>22)</sup> Z těchto výsledků je zřejmé, že v lamelárních doménách v mezibuněčných prostorech není lokalizována téměř žádná voda.

Fourierova transformační infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce a elektronová rotační rezonance patří mezi techniky, které nejsou schopné zjistit lokální změny v organizaci lipidů.

Norlén et al<sup>23)</sup> studovali bobtnání SC na úrovni světelné mikroskopie a zjistili, že bobtnání se uskutečňuje hlavně ve směru kolmém na povrch kůže. Bobtnání izolovaných korneocytů studovali Richter et al<sup>24)</sup> skanovací silovou mikroskopií. Za účelem získat podrobnější informace o lokalizaci volné vody v SC byl zmrazený vzorek zkoumán elektronovou mikroskopií.<sup>25)</sup> Tato studie odhalila, že při vysokém stupni hydratace SC je voda lokalizovaná uvnitř korneocytů a v mezibuněčných oblastech. V mezibuněčných oblastech se často zobrazily vodní domény. Téměř kompletní nepřítomnost bobtnání lamel, necitlivost lipidů ke stupni hydratace a přítomnost vodních domén vedla k závěru, že voda a lipidy SC jsou nejspíše oddělené fáze a že stupeň hydratace v hlavních oblastech je velmi omezený.

Protože SC je ochranná vrstva mezi vysoce hydratovanou životaschopnou epidermis a relativně suchým okolním prostředím, bylo navrženo, že v SC existuje vodní gradient. Tento vodní gradient byl dokonce změřený in vivo u lidí.<sup>26,13)</sup>

Do této doby nebyla voda koncentrovaná hluboko v SC. Klíčem úspěchu je porozumět mechanismu bobtnání korneocytů, zatímco buňky jsou úplně obklopeny lipidy chemicky spojenými se zrohovatělým obalem. Tyto lipidy jsou uspořádány v krystalickém stavu a uplatňují se jako vzor během utváření mezibuněčných lamel. Kvůli tomuto těsnému uspořádání se očekává, že se bobtnání korneocytů musí objevit bez toho, aniž by se snížila hustota těchto lipidů, a tak bez značné změny celkového povrchu korneocytů.

### **2.4.3.1 Studie zaměřená na přezkoumání interakcí vody a lipidů SC**

Cílem studie je přezkoumat interakce vody pomocí Fourierovy transformační infračervené spektroskopie a poskytnout informaci o lokalizaci vody v SC.

Izolace a hydratace lidské kůže a SC: Kůže lidského břicha nebo prsu byla získána po chirurgickém zákroku a zpracována týž den. Podkožní tuk byl odstraněn a kůže ztenčena na tloušťku přibližně 250 $\mu$ m - 300 $\mu$ m. Kůže byla sycena roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo čistou vodou po dobu 24 hodin podle popisu uvedeného dále pro SC. K získání SC byla kůže inkubovaná svou dermální stranou na Whatmanově papíru namočeném v 0,1% roztoku trypsinu v 0,15M fosfátovém pufru (NaCl 8g/l, KCl 0,19 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,4 g/l) přes noc při teplotě 4°C a jednu hodinu při 37°C. Potom bylo SC odděleno od epidermis. Následovalo sycení SC při 37°C buď nad Silikagelem, 27% roztokem NaCl, nasyceným roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo čistou vodou po 24 hodin. Poté bylo SC nařezáno na malé kousky. Všechny pokusy byly provedeny alespoň se třemi SC od různých dárců.

Vážení SC: Za účelem určit obsah vody bylo SC nařezáno na čtyři kusy, každý na 2,5 x 8 mm. Před hydratací bylo SC sušeno nad Silikagelem a váženo na mikrováhách (systém Mettler 3000), poté byly kusy nasazeny na síťku. Následovalo sycení SC při 37°C po dobu 24 hodin nad různými roztoky. Stupeň hydratace byla vypočítána tímto způsobem:

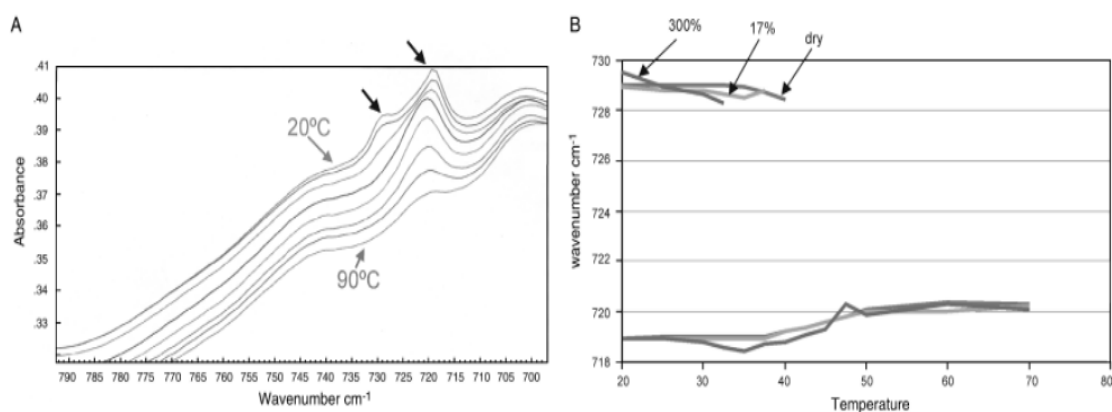
$$\% = 100 \times (\text{hmotnost hydratovaného SC} - \text{hmotnost suchého SC}) / \text{hmotnost suchého SC}.$$

Fourierova transformační infračervená spektroskopie: Před Fourierovou transformační infračervenou spektroskopií bylo SC hydratováno po 24 hodin nad roztoky solí připravených z deuteriové vody. Pak byly vzorky přitisknuty mezi desky zhotovené z chloridu stříbrného. Fourierova transformační infračervená spektra byla získána při 2 cm<sup>-1</sup> po 2,5°C v intervalu od 20°C do 50°C a po 5°C v intervalu od 50°C do 90°C na Biorad spektrometru vybaveném širokou skupinou detektorů. Pak byla spektra analyzována s WIN IR Pro 2.5 software.

**Výsledky:** 1) Stupeň hydratace

Stupeň hydratace SC po hydrataci nad roztokem NaBr se pohyboval mezi 18% a 26%. Rovnováha nad roztokem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  má za následek podstatnou změnu hydratace, která je mezi 57% a 87%. Stupeň hydratace po hydrataci nad čistou vodou se měnil mezi 292% a 332%. Variace ve stupni hydratace jsou nejspíš způsobené buď vysokou citlivostí SC na malé změny v relativní vlhkosti prostředí nebo kvůli střídání množství přirozených zvlhčujících faktorů mezi různými dárči.

2) Orthorhombický – hexagonální fázový přechod je mírně ovlivněn stupněm hydratace. Na obr.2a<sup>23)</sup> je ukázaný typický příklad kmitočtu vibrujících –  $\text{CH}_2$  – skupin lipidů SC jako funkce teploty. Orthorhombická fáze je charakterizovaná rozštěpením skupin, které má za následek zdvojení při vlnočtu přibližně okolo  $730\text{ cm}^{-1}$ . Zvýšení teploty na asi  $35^\circ\text{C}$  má za následek zmizení rozštěpení skupin. Toto je vlastnost pro přechodné stádium z orthorhombické na hexagonální postranní uspořádání. Malé snížení teploty přechodu je pozorováno, když se zvýší stupeň hydratace (viz obr. 2b<sup>23)</sup>).



**Obr. 2** Orthorhombický – hexagonální přechod s využitím Fourierovy transformační infračervené spektroskopie. **(A)** Typický je ukázaný na kmitočtu vibrujících –  $\text{CH}_2$  – skupin jako funkce teploty v suchém SC. Pod  $30^\circ\text{C}$  způsob rozštěpení na dvě pásma (štěpení skupin) charakteristický pro orthorhombické uspořádání. Nad  $40^\circ\text{C}$  je vidět pouze jedno pásmo signalizující hexagonální postranní uspořádání. **(B)** Teplotní závislost kmitočtu

jako funkce teploty pro SC jednoho dárce. Podobná závislost kmitočtu byla pozorována u ostatních dárců také (bylo použito SC tří dárců).<sup>23)</sup>

### 3) Voda v SC není rovnoměrně distribuovaná a nemění

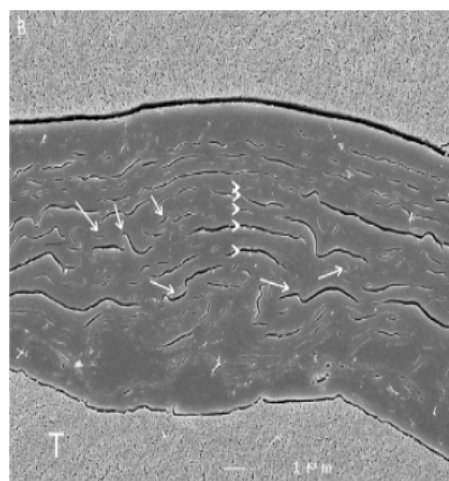
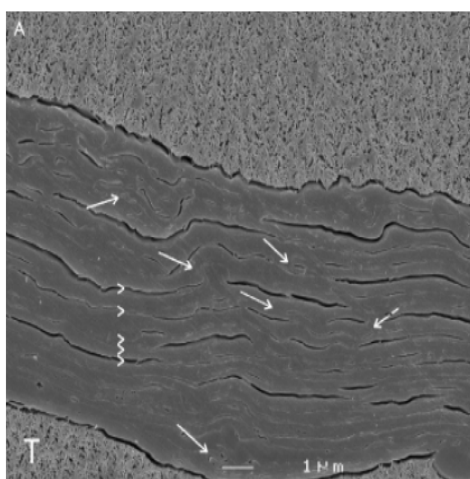
se postupně s hloubkou suchého SC. Mnohonásobně zvětšený obraz suchého SC je na obr. 3a<sup>23)</sup>. Na obou stranách SC je vidět usazený materiál, což se projevilo nerovným povrchem. Při silné modulaci jsou buňky vzájemně propleteny. Toto bylo částečně pozorováno na konci buněk (obr. 3a, b)<sup>23)</sup>. V suchém SC byly poměrně často pozorovány vlny buněčných obrysů. Tyto vlny nebyly rovnoměrně distribuovány v SC. Žádná postupná změna ve tvaru mezi korneocyty v povrchové, střední a hlubší oblasti SC nebyla pozorována. Průměrná buněčná tloušťka byla  $360 \pm 27$  nm.

**SC hydratováno nad roztokem NaBr (18% - 26%):** Získaná vyobrazení neukázala téměř žádný kontrast. V některých oblastech SC jsou pozorovatelné vlny a vzájemné propletení (obr. 3b, šipky<sup>23)</sup>). Průměrná buněčná tloušťka je  $370 \pm 21$  nm. Malý výskyt kontrastu ukazuje absenci oblastí s volnou vodou.

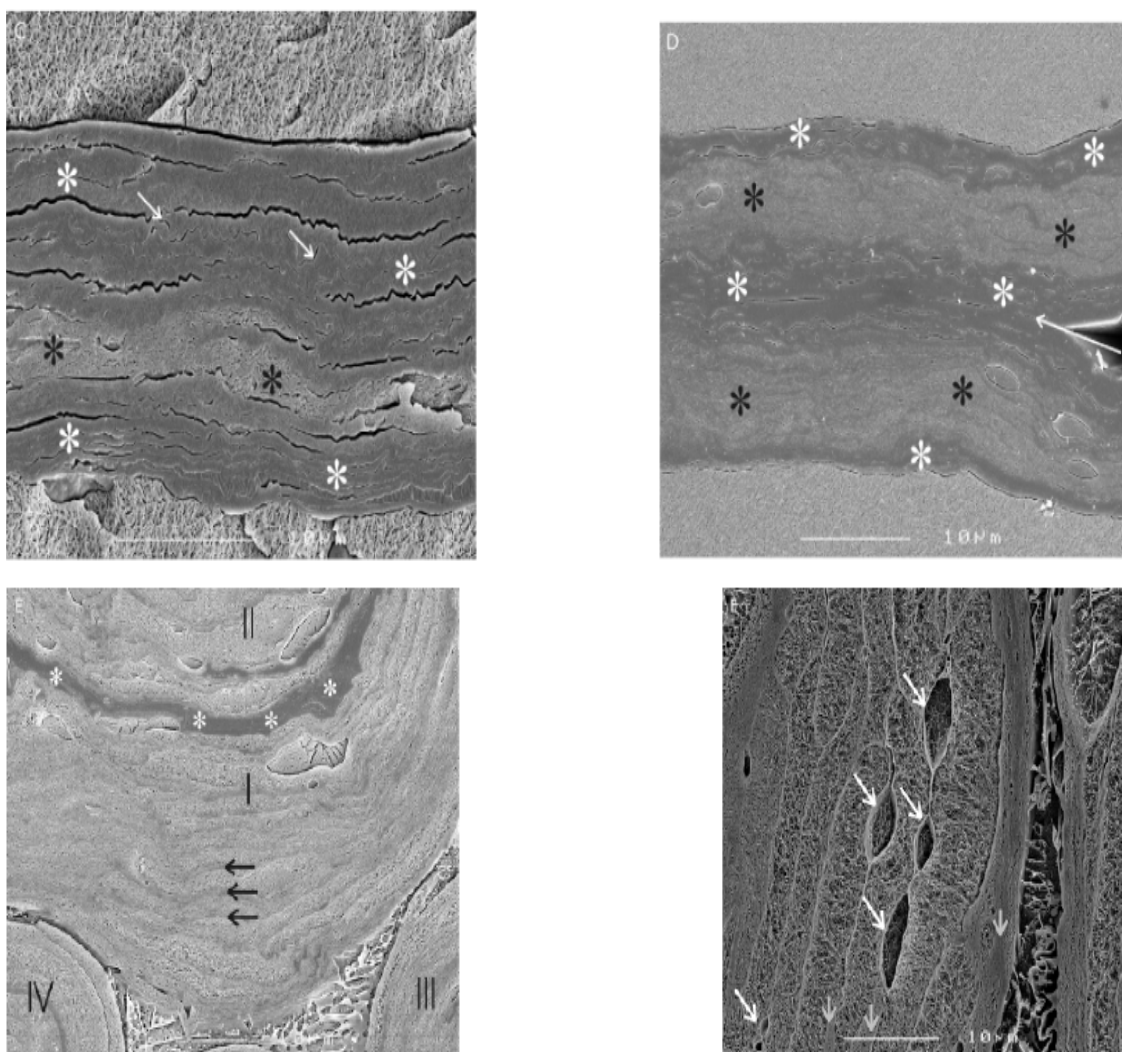
**SC hydratováno nad nasyceným roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (57% - 87%):** Průměrná tloušťka SC se zvýšila až na  $750 \pm 100$  nm. Jak je znázorněno na obr. 3c, d<sup>23)</sup>, je vidět nehomogenní vzhled. V nejhlubších oblastech SC a povrchových vrstvách SC je vzhled podobný jako u SC hydratovaného na 17% obsah vody. Znázornění ve střední oblasti SC odhalí větší kontrast, indukující přítomnost volné vody v korneocytech v těchto oblastech. Přítomnost vody je také demonstrována větší tloušťkou ve středních oblastech SC ve srovnání s tloušťkou v povrchové a hlubší části SC. Znázornění neodhaluje žádné údaje o doménách bohatých na vodu v mezibuněčných oblastech SC. Toto silně naznačuje, že většina volné vody je odebrána do korneocytů. V oblastech s malým kontrastem může být vlnění stále pozorováno (obr 3c, šipky<sup>23)</sup>).

**SC hydratováno nad čistou vodou (292% - 332%):** Na obr. 3e<sup>23)</sup> jsou zobrazeny příčné řezy čtyř plně hydratovaných vzorků nabobtnaného SC, označeny římskými číslicemi I, II, III a IV. SC I a SC II jsou uloženy takovým způsobem, že na příčném řezu jsou v kontaktu nejhlubší oblasti SC vzorku I a II

(viz obr. 3b<sup>23</sup>) pro vysvětlení uložení SC). Obr. 4e<sup>23</sup> zřetelně ukazuje nezbobtnalou oblast (malý kontrast). Tato oblast obsahuje dvě až tři nejhlubší vrstvy korneocytů každého vzorku SC mající malou tloušťku (viz hvězdičky) a malý kontrastní vzhled, obě ukazují, že tyto buňky neobsahují volnou vodu. Buňky přiléhající k této oblasti jsou silně zbobtnalé. Zbobtnalé buňky jsou charakterizované velkým kontrastem. Vzhled indikuje přítomnost mnoha vodních domén mezi vlákny keratinu. V některých oblastech se dokonce střídá pořadí zbobtnalých a nezbobtnalých buněk (obr. 4e, malé šipky<sup>23</sup>). Jsou pozorovány rozdíly v bobtnání korneocytů v různých oblastech vysvětlené rozdílnou hustotou děr způsobených vodními doménami a mírně menším kontrastem ve vzhledu těchto buněk. Průměrná tloušťka nabobtnalých korneocytů je přibližně  $2970 \pm 260$  nm. V plně hydratovaném SC není voda pouze odebrána do korneocytů, ale je také přítomná v doménách v mezibuněčných oblastech. Znázornění na obr. 4f zřetelně ukazuje přítomnost velkých a mnoha malých zásobníků vody. Mezibuněčné vodní domény mají oválný tvar, nejspíše minimalizují styčnou plochu mezi hydrofilní vodou a doménami lipofilních lipidů. Obrysy buněk v plně hydratovaném SC jsou ještě mírně zvlněné, ale je zobrazeno menší vlnění, než bylo pozorováno v suché kůži. Konce buněk jsou více kulaté. Často bylo pozorováno, že střední část buněk byla více zbobtnalá než oblasti přiléhající ke koncům buněk.







**Obr. 3<sup>23)</sup>** Mnohonásobně zvětšené obrázky kryoskanovací elektronové mikroskopie SC hydratovaného na různé stupně (**A**) Suché SC je charakterizováno obrázkem s malým kontrastem. Všimněte si, že (viz šipky) na tomto obrázku jsou vidět vlny a vzájemné propletení buněk. Vlny jsou často pozorovány blízko zakončení korneocytů. Buňky mají tloušťku přibližně 360 nm. Kótovací šipka ukazuje hranice buňky, T, medium pro zmrazení tkání. Prostory mezi korneocyty v suchém a v hydratovaném SC na 17% obsah vody (viz B) jsou prostory nejvíce vyplněné vzduchem. Prostory by mohly být způsobeny sušením SC potřebného pro nízký stupeň hydratace. (**B**) SC hydratováno na 17% obsah vody odhalí obrázek s malým kontrastem, podobně je tomu při pozorování suché kůže. To ukazuje absenci zásobníků vody. Šipky ukazují vlny nebo vzájemné propletení buněk. Kótovací šipky ukazují hranice buňky. (**C**) SC hydratováno na 70% obsah vody odhalí ve střední části mírně

nabobtnalé buňky s větším kontrastem (viz černé hvězdičky) indikující přítomnost vody. V horní a spodní části vyobrazení SC je to podobné jako u suché kůže (bílé hvězdičky). Bílé šipky ukazují vlny a vzájemná proplétání. **(D)** Dva vzorky hydratované na 90% hmotnosti. Bílé šipky ukazují styčné plochy mezi vzorky. Oba vzorky vykazují zvýšený stupeň hydratace ve středních oblastech (větší kontrast, viz černé hvězdičky) a malý kontrast v povrchové a nejnižší části SC (bílé hvězdičky). Všimněte si, že buňky ve střední části SC jsou také silně zbobtnalé. **(E)** Čtyři vzorky SC (I – IV) hydratované na 300% hmotnosti. Většina korneocytů je značně zbobtnalá a korneocyty jsou charakterizovány sítí vláken keratinu s vodou. Příležitostně jsou vidět střídající se oblasti silně zbobtnalých a méně zbobtnalých buněk (viz černé šipky). Dokonce jedna buňka vykazuje velké odlišnosti v buněčné tloušťce. Ačkoli je obtížné kvantitativní určení, vlna se zdá být menší ve srovnání se suchým SC. Nejnižší oblasti SC u vzorku I a II jsou v kontaktu. Kupodivu nejsou korneocyty v těchto oblastech zbobtnalé (oblasti s malým kontrastem vyznačené bílými hvězdičkami). **(F)** Mnohonásobné zvětšení plně hydratovaného vzorku SC. Keratinová síť je zřetelně zobrazená. Tato síť je obklopená zrohovatělým obalem. Mezi buňkami jsou často pozorovány velké a velmi malé zásobníky vody (viz bílé šipky). Pokud nejsou přítomny zásobníky vody, jsou pozorovány mezi buňkami těsné kontakty. Konce buněk jsou kulaté a je pozorováno méně vln v porovnání se suchým SC nebo SC hydratovaným asi na 20% obsahu vody. Znovu je zaznamenán rozdíl ve stupni bobtnání mezi různými buňkami. Buňky, které jsou méně zbobtnalé, jsou označeny krátkými šipkami.<sup>23)</sup>

## **2.5 Hydratace kůže**

Hydratace pokožky je významně ovlivněna obsahem a složením tuků v epidermis, které se tvoří především v keratinocytech. Část tuků se na povrch kůže, kde jsou součástí hydrolipidového filmu, dostává také vlivem produkce mazových žláz. Film na povrchu udržuje kůži vláčnou, pružnou a představuje významnou bariéru proti bakteriím a plísním. Byla vyvinuta řada metod umožňujících měření hydratace pokožky.

### **2.5.1 Měření hydratace kůže**

Měření hydratace kůže *in vivo* patří k základním neinvazivním postupům, které jsou využívány ve fyziologických i patologických šetřeních, při diagnostice onemocnění a zejména při testování účinnosti kosmetických a dermatologických prostředků.

K měření hydratace kůže lze použít metody **přímé** [měření kapacity, impedance (odporu) a vodivosti (konduktivity)] a dále **nepřímé** [měření elasticity; kolorimetrie, gravimetrie, echografie, nukleární magnetická rezonance, FTIR (Fourierova infračervená transformační spektrofotometrie)], přičemž se jednotlivá měření vzájemně doplňují. V běžné praxi se používá zejména měření kapacity a elektrického odporu.<sup>27)</sup>

### **2.5.2 Přímé měření na principu kapacity**

Dvě kovové desky oddělené tenkou vrstvou izolátoru se označují jako kondenzátor, neboť umožňují hromadit elektrický náboj. Záporný pól má přebytek elektronů, kladný nedostatek. Po zapojení proudí elektrony od záporného pólu ke kladnému, až se vyrovnají. Schopnost vodivých těles hromadit náboj se nazývá elektrická kapacita. Jednotkou je 1 farad (1 F). (Kapacitu 1 F má kondenzátor, který při napětí 1 V pojme náboj 1 coulombu). Kapacita je tím větší, čím je větší plocha desek a menší jejich vzdálenost. Závisí ale i na vlastnostech dielektrika.

Byla vyvinuta měřicí sonda Corneometru, kdy na keramické destičce 7 x 7 mm jsou paralelně zapojené zlaté proužky umístěné velmi blízko u sebe (viditelné lupou) a zatavené speciálním skleněným krytem. Proužky mají charakter desek kondenzátoru. Žádný elektrický náboj touto izolací nemůže projít do kůže, tudíž nedochází k žádnému galvanickému spojení. U ideálních kondenzátorů je stejnosměrné pole mezi deskami, ale u skutečných vzniká na okrajích desek zvláštní rozptylové pole, které se zmenšuje úměrně se vzrůstající vzdáleností. Corneometr právě využívá tohoto nežádoucího efektu. Jestliže se sonda s rozptylovým polem dotkne kůže (vody), vzroste její kapacita, což je měřitelné. Zvláštní konstrukce sondy umožňuje standardní přitlak na kůži a tím i měření do stejné hloubky. Měřicí proces je aktivován přitisknutím sondy ke kůži, měření trvá 1 s, za 20 s je každý měřicí čas

zprůměrnován a zkalibrován. Konec měření oznámí akustický signál. Naměřená hodnota se objeví na displeji.

### **2.5.2.1 Podmínky měření**

Při měření je třeba zajistit stabilní vnější vlivy - zejména vlhkost a teplotu vzduchu. Nejlepší je klimatizovaná místnost bez proudění vzduchu. Důležité je zajistit stabilní přitlak sondy na kůži celou plochou, měřit mimo ochlupená místa, na stejném místě a musíme také vyloučit vliv statické elektřiny. Při omytí sondy alkoholem je nutné ji osušit jemnou utěrkou, protože zbytky alkoholu a vody mohou ovlivnit měření.

Corneometr se stal pro speciální řešení sondy celosvětově uznávaným přístrojem, který je považován za standard. Vykazuje opakovatelnost výsledků, krátké měřicí časy i ekonomičnost, snadné ovládání, měření je zcela neinvazivní. Měření je vhodné provádět v klimatizovaných místnostech při 21 °C a vlhkosti vzduchu 42 %.

### **2.5.3 Přímé měření na principu vodivosti (konduktivity) a impedance**

Měrná vodivost (konduktivita, specifická vodivost) je převrácená hodnota měrného odporu. V technické praxi se užívá jednotka  $S \cdot m/mm^2$  (vodivost drátu délky 1 m a průřezu  $1 mm^2$ ). Konduktometrie je měření elektrické vodivosti elektrolytů. Tok elektrického proudu v roztocích je přenášen ionty elektrolytu. Vodivost je závislá na jejich koncentraci, rychlosti pohybu a počtu nábojů (valenci). Jednotkou je siemens (S).

Impedance (Z) (zdánlivý, impedanční odpor) je veličina charakterizující vztah mezi napětím a proudem v lineárních elektrických obvodech (převrácená hodnota se jmenuje admitance). Zdánlivý odpor Z sériově zapojeného odporu R a indukčního odporu  $X_L$  se vypočte podle vzorce:  $Z = \sqrt{R^2 + X_L^2}$  a Ohmova zákona pro střídavý proud, který má tvar:  $I=U/Z$  [A; V;  $\Omega$ ].<sup>27)</sup>

### **3 PRACOVNÍ ÚKOL**

Tato práce patří do skupiny prací zaměřených na hodnocení interakcí kožních lipidů pomocí diferenční skanovací kalorimetrie. Jedná se o široce zaměřenou problematiku, z níž tato práce řeší úsek týkající se přítomnosti vody v hodnocených vzorcích.

Pracovní úkol je členěn na několik dílčích úkolů:

- 1) Při DSC měření je nutné počítat s tím, že teplotní rozsah se bude pohybovat od minusových teplot až k teplotám bodu varu vody, přičemž téměř všechny vzorky budou vodu obsahovat. Pro takový teplotní rozsah se neosvědčily běžně používané hliníkové kelímky, z nichž voda při vyšší teplotě uniká. Jako řešení se jeví možnost využití hermeticky uzavíratelných kelímků.

Dílčí úkol se týká následující problematiky:

úniku vody z hermeticky uzavíratelných kelímků

hodnocení fázových přechodů vody

srovnání naměřených hodnot při použití obou druhů kelímků

- 2) Při přípravě lipidických membrán se používá tris pufr. Dílčí pracovní úkol je zaměřen na zjištění kalorimetrických charakteristik tris pufru a jejich porovnání s vodou a vlivu tris pufru na kalorimetrické charakteristiky složek lipidických membrán.
- 3) Další dílčí úkol se týká přítomnosti vody v epidermis a stratum corneum. Pozornost bude zaměřena na dobu sušení a sycení vzorků.
- 4) Pro doplnění a pozdější srovnání je uvedeno kalorimetrické hodnocení emulzní soustavy.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Použité přístroje

### **DSC kalorimetr 200 Phox®**

výrobce: Netzsch – Gerätebau

sériové číslo: 2406129 H

teplotní rozsah: -150 °C až 600 °C

zahřívání: cirkulační topné těleso kolem senzoru

rychlost ohřevu: -0,1 až 99,9 °C/min

signálová čárová konstanta: approx. 3 sek.

kalorimetrický rozsah:  $\pm 750$  mW

citlivost kalorimetru: 4 až 4,5  $\mu\text{V/mW}$  (pro indium)

kalibrace: na In, Hg, Sn, Bi, Zn, CsCl

chlazení: tekutý dusík

rychlost proplachovacího plynu: 20 ml/s

kelímky hliníkové o objemu 25  $\mu\text{l}$

kelímky odolávající tlaku 10MPa o objemu 27  $\mu\text{l}$

reprodukovatelnost teplotního signálu:  $\pm 0,2$  K (indium)

reprodukovatelnost signálu tepelného toku:  $\pm 1\%$  (indium)

hnací a ochranný plyn – plynný dusík (Linde Technoplyn)

nádoba s kapalným dusíkem

**Digitální analytické váhy CAHN 26** (sériové č. 39562; USA)

**Ruční lis Netzsch** (6.239.3 – 80.1) pro víčkování hliníkových kelímků

**pH - metr**

## 4.2 Seznam použitých surovin

Destilovaná voda

Cetylalkohol

Bílý vosk

Heptahydrát síranu zinečnatého

Hydrogenfosforečnan sodný

Dihydrogenfosforečnan sodný

Chlorid sodný

Cholesterolsulfát

Tris pufr

Fyziologický roztok



## **4.3 Pracovní postup**

### **4.3.1 ÚKOL Č. 1**

#### **4.3.1.1 Příprava vzorků**

Vodu jsme navážily na dno kelímku, u něhož jsme předem na analytických vahách zjistily hmotnost. Kelímek s víčkem jsme pomocí pinzety vložily do ručního lisu, kde došlo k uzavření. Poté jsme kelímek znovu zvážily a vypočítaly hmotnost navážky s přesností 0,001 mg.

Před vlastním měřením jsme umístily kelímek do přístroje. Odstranily jsme vrchní kryt komory, další dva vnitřní kryty a kelímek se vzorkem jsme opět pinzetou položily vpravo, přesně na střed vymezené plochy senzoru tepelného toku. Vlevo jsme umístily prázdný kelímek sloužící jako referenční vzorek. Komoru jsme postupně uzavřely všemi kryty.

#### **4.3.1.2 Vlastní měření**

Ve speciálním programu pro měření na přístroji DSC 200 firmy Netzsch jsme zadaly potřebné parametry a nadefinovaly teplotní program měření.

Teplotní program zahrnoval teplotu počátečního stavu, cílovou teplotu zahřívání nebo chlazení, rychlost ohřevu nebo chlazení, možné izotermy s časově omezenou konstantní teplotou a teplotu konečného stavu.

Měření probíhalo v dusíkové atmosféře.

#### **4.3.1.3 Způsob vyhodnocování**

Po skončení měření byla data vyhodnocena pomocí speciálního programu Netzsch Proteus Analysis, který je firmou dodáván současně s přístrojem.

U všech vzorků za daných podmínek byly pro potřeby naší práce stanovovány tyto parametry:

$\Delta H$ – teplo tání/tuhnutí	odpovídá ploše vymezené píkem DSC křivky
$T_p$ - teplota píku	teplota odpovídající tání/tuhnutí převážného množství látky

## **4.3.2 ÚKOL Č. 2**

### **4.3.2.1 Příprava vzorků**

- Pro měření byl použit
- a) 0,22% roztok obsahující 0,00182g cholesterolsulfátu a 0,81010 g tris pufru, k vlastnímu pokusu bylo použito 18,77mg.
  - b) roztok tris pufru
  - c) demineralizovaná voda

Vzorky jsme navážily na dno kelímku, u něhož jsme předem na analytických vahách zjistily hmotnost. Kelímek s víčkem jsme pomocí pinzety vložily do ručního lisu, kde došlo k uzavření. Poté jsme kelímek znovu zvážily a vypočítaly hmotnost navážky s přesností 0,001 mg.

Před vlastním měřením jsme umístily kelímek do přístroje. Odstranily jsme vrchní kryt komory, další dva vnitřní kryty a kelímek se vzorkem jsme opět pinzetou položily vpravo, přesně na střed vymezené plochy senzoru tepelného toku. Vlevo jsme umístily prázdný kelímek sloužící jako referenční vzorek. Komoru jsme postupně uzavřely všemi kryty.

### **4.3.2.2 Vlastní měření**

Ve speciálním programu pro měření na přístroji DSC 200 firmy Netzsch jsme zadaly potřebné parametry a nadefinovaly teplotní program měření.

Teplotní program zahrnoval teplotu počátečního stavu, cílovou teplotu zahřívání nebo chlazení, rychlost ohřevu nebo chlazení, možné izotermy s časově omezenou konstantní teplotou a teplotu konečného stavu.

Měření probíhalo v dusíkové atmosféře.

### **4.3.2.3 Způsob vyhodnocování**

Po skončení měření byla data vyhodnocena pomocí speciálního programu Netzsch Proteus Analysis, který je firmou dodáván současně s přístrojem.

U všech vzorků za daných podmínek byly pro potřeby naší práce stanovovány tyto parametry:

$\Delta H$ – teplo tání/tuhnutí	odpovídá ploše vymezené píkem DSC křivky
$T_p$ - teplota píku	teplota odpovídající tání/tuhnutí převážného množství látky

### 4.3.3 ÚKOL Č. 3

#### 4.3.3.1 Příprava epidermis

K pokusu byla použita epidermis získaná z prasečích uší, která se zpracovávají následovně: Používají se uši bachyň poražených na jatkách. Uši se mají zpracovat nejlépe týž den. Postupuje se takto:

1. Uši se omyjí a osuší.
2. Vnější strana ušního boltce se oholí holícím strojkem.
3. Okraj ucha se nůžkami zastříhne.
4. Pomocí skalpelu se oddělí kůže od chrupavky.
5. Kůže se ponoří do fyziologického roztoku. Roztok se 2x – 3x vymění.
6. Poté se z kůže nastříhají čtverečky, které se na 1 minutu ponoří do destilované vody při teplotě 60 °C.
7. Nyní se snadno oddělí epidermis od kůže.
8. Získaná epidermis se vloží do destilované vody při pokojové teplotě a přenesse se na předem vytárovanou sítku. Sítka s epidermis se osuší na filtračním papíře.

#### 4.3.3.2 Provedení úkolu

Úkol je zaměřen na dobu sycení a sušení epidermis. Je porovnána epidermis získaná ihned po stažení z uší a epidermis, která byla 10 dní po zpracování v mrazničce při teplotě -20 °C.

Měření probíhalo na analytických vahách.

#### 4.3.3.3 Způsob vyhodnocování

V tabulkách je uvedeno číslo vzorku, výchozí hmotnost, hmotnost po určitém počtu dní a hmotností přírůstek/úbytek v %.

Dále jsou použity tyto symboly:

x	aritmetický průměr
s	směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}.$$
$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

N – počet členů  
 $x_i$  – i-tý člen  
 $\bar{x}$  - aritmetický průměr

R                      rozpětí (rozdíl největší  
a nejmenší hodnoty)

#### 4.3.4 ÚKOL Č. 4

##### 4.3.4.1 Příprava vzorků

Pro měření byly připraveny dva různé vzorky. První vzorek je směs obsahující 90% bílého vosku (cera alba) a 10% cetylalkoholu. Druhý vzorek byl připraven smísením 90% cera alba a 10% cetylalkoholu, navíc byla přimíchána destilovaná voda v množství, které odpovídá 30% hmotnosti předem vytvořené směsi.

Při přípravě se obě suroviny roztavily pod UV lampou a míchaly do vychladnutí.

##### 4.3.4.2 Vlastní měření

Ve speciálním programu pro měření na přístroji DSC 200 firmy Netzsch jsme zadaly potřebné parametry a nadefinovaly teplotní program měření.

Teplotní program zahrnoval teplotu počátečního stavu, cílovou teplotu zahřívání nebo chlazení, rychlost ohřevu nebo chlazení, možné izotermy s časově omezenou konstantní teplotou a teplotu konečného stavu.

Měření probíhalo v dusíkové atmosféře.

##### 4.3.4.3 Způsob vyhodnocování

Po skončení měření byla data vyhodnocena pomocí speciálního programu Netzsch Proteus Analysis, který je firmou dodáván současně s přístrojem.

U všech vzorků za daných podmínek byly pro potřeby naší práce stanovovány tyto parametry:

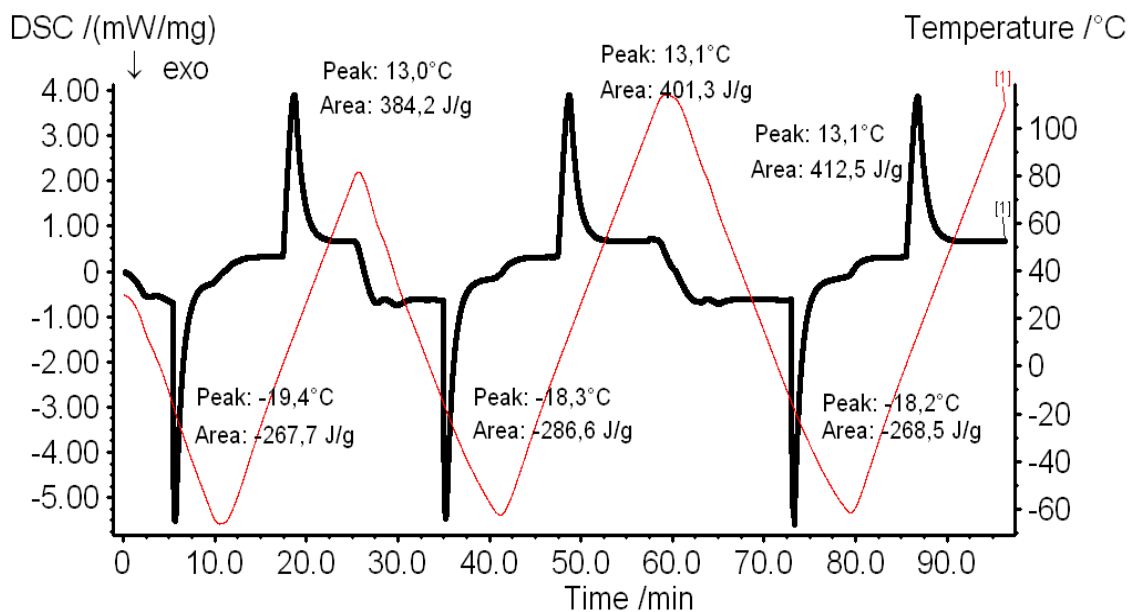
$\Delta H$ – teplo tání/tuhnutí	odpovídá ploše vymezené píkem DSC křivky
$T_p$ - teplota píku	teplota odpovídající tání/tuhnutí převážného množství látky

## **5 VÝSLEDKY MĚŘENÍ**

## 5.1 Výsledky měření

### 5.1.1 ÚKOL Č. 1

**Graf č. 1 DSC záznam opakovaného chlazení a ohřevu vody v hermeticky uzavřených kelímcích**



Podmínky měření:

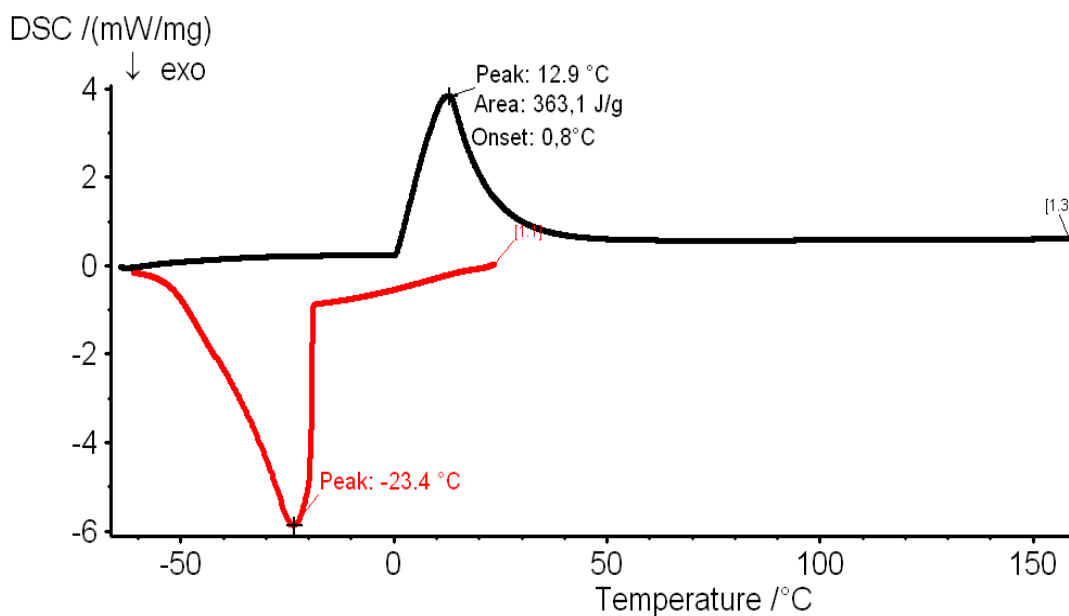
- počáteční teplota 32 °C
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 80 °C (10 °C /min)
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 110 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 110 °C (10 °C/min)

**Tab. č. 1 Hodnoty fázových přechodů vody**

Pořadové číslo měření	Fázový přechod					
	kapalina - tuhá látka		Tuhá látka - kapalina		kapalina - plyn	
	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
1	-19,4	-267,7	13,0	384,2	–	–
2	-18,3	-286,6	13,1	401,3	–	–
3	-18,2	-268,5	13,1	412,5	–	–

Hmotnost vody = 19,480 mg

**Graf č. 2a DSC záznam průběhu chlazení a ohřevu vody do 160 °C**  
(na prokázání fázového přechodu kapalina – pára)



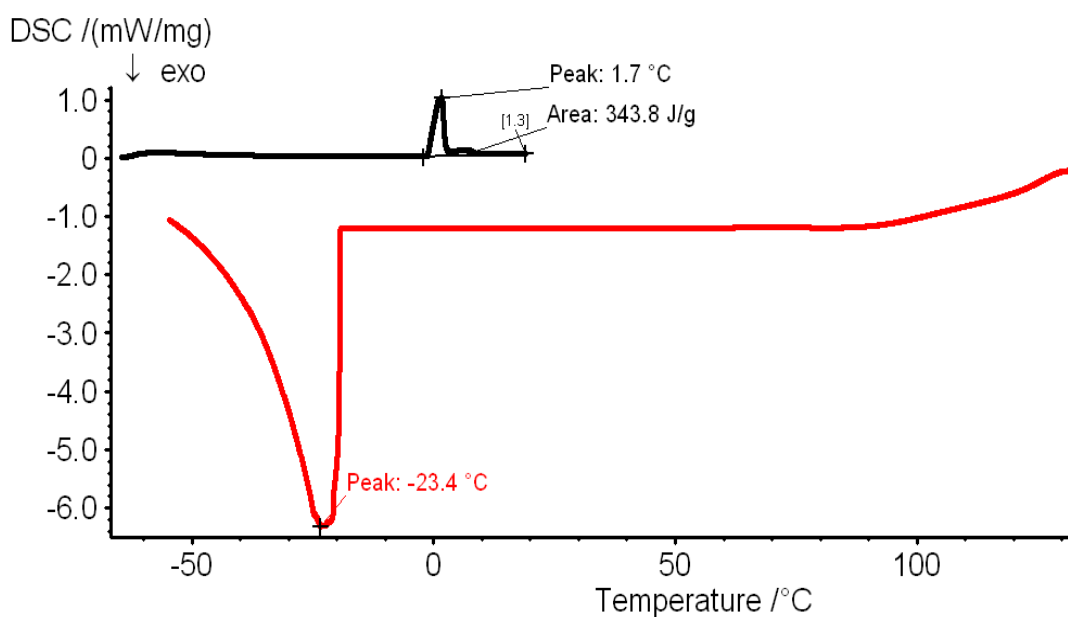
Podmínky měření:

- počáteční teplota 24 °C
- chlazení do -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 160 °C (10 °C/min)

**Tab. č. 2a Hodnoty fázových přechodů vody**

Fázový přechod					
kapalina – tuhá látka		tuhá látka - kapalina		kapalina - plyn	
$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
-23,4	–	12,9	363,1	–	–

**Graf č. 2b DSC záznam průběhu chlazení ze 135 °C a následujícího ohřevu do 25 °C** (důkaz přítomnosti vody v kelímku i po zahřátí na teplotu vyšší, než je var vody)



Podmínky měření:

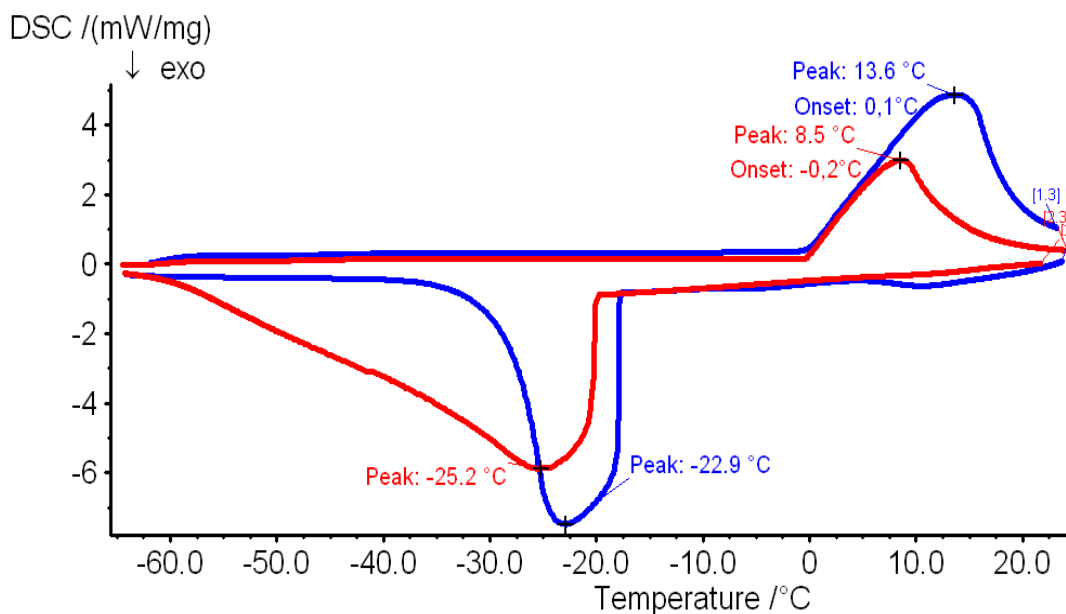
- počáteční teplota 135 °C
- chlazení na -60 °C (20 °C/min)
- izoterma 3 minuty
- zahřátí na 25 °C (1 °C/min)

**Tab. č. 2b Hodnoty fázových přechodů vody**

Fázový přechod					
kapalina - tuhá látka		tuhá látka - kapalina		kapalina - plyn	
$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
-23,4	–	1,7	343,8	–	–



**Graf č. 3a Vliv hmotnosti kelímku na měření DSC (rozdílné navážky vody)  
první chlazení a první ohřev**



Modře hliníkový kelímek (hmotnost vody = 24,083 mg)

Červeně kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa  
(hmotnost vody = 18,248 mg)

Podmínky měření:

1. kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa

- počáteční teplota 21 °C
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (5 °C/min)
- izoterma 5 minut
- chlazení na -60 °C (5 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (2 °C/min)

2. hliníkový kelímek

- počáteční teplota 24 °C
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (10 °C/min)

- izoterma 5 minut

- chlazení na -60 °C (5 °C/min)

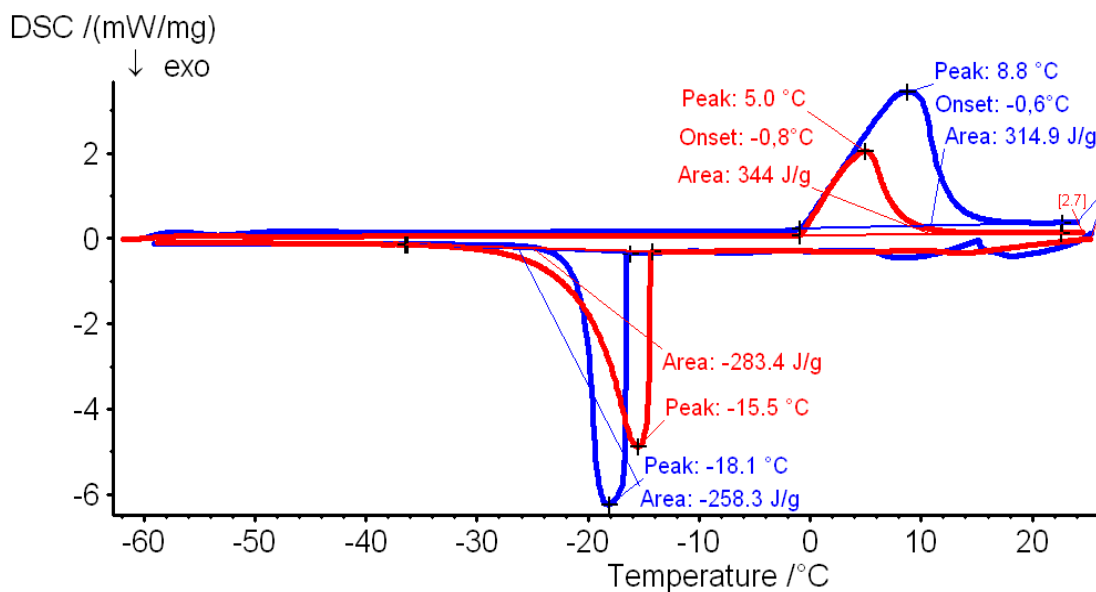
- izoterma 5 minut

- ohřev na 25 °C (5 °C/min)

**Tab. č. 3a Hodnoty fázových přechodů vody**

	Fázový přechod					
	kapalina – tuhá látka		tuhá látka - kapalina		kapalina - plyn	
	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
hliníkový kelímek - první chlazení	-22,9	-238,1	–	–	–	–
hliníkový kelímek - první ohřev	–	–	13,6	–	–	–
kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa - první chlazení	-25,2	–	–	–	–	–
kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa - první ohřev	–	–	8,5	–	–	–

**Graf č. 3b Vliv hmotnosti kelímku na měření DSC (rozdílné navážky vody)  
druhé chlazení a druhý ohřev**



Modře hliníkový kelímek (hmotnost vody = 24,083 mg)

Červeně kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa  
(hmotnost vody = 18,248 mg)

Podmínky měření:

1. kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa

- počáteční teplota 21 °C
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (5 °C/min)
- izoterma 5 minut
- chlazení na -60 °C (5 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (2 °C/min)

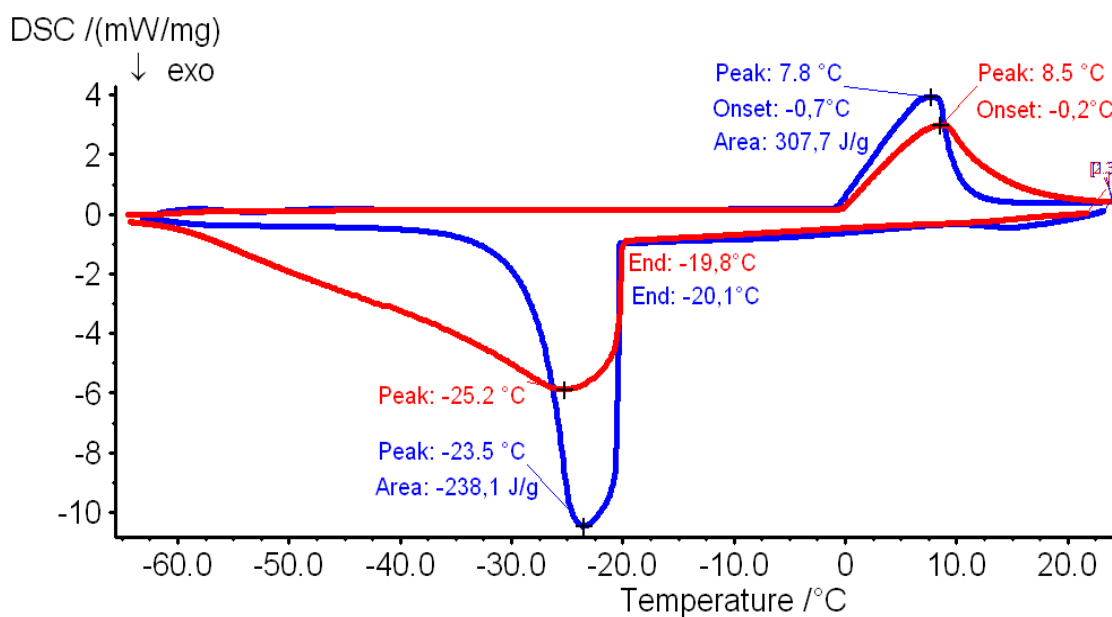
2. hliníkový kelímek

- počáteční teplota 24 °C
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (10 °C/min)
- izoterma 5 minut
- chlazení na -60 °C (5 °C/min)
- izoterma 5 minut
- ohřev na 25 °C (5 °C/min)

**Tab. č. 3b Hodnoty fázových přechodů vody**

	Fázový přechod					
	kapalina - tuhá látka		tuhá látka - kapalina		kapalina - plyn	
	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
hliníkový kelímek - druhé chlazení	-18,1	-258,3	–	–	–	–
hliníkový kelímek -druhý ohřev	–	–	8,8	314,9	–	–
kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa - druhé chlazení	-15,5	-283,4	–	–	–	–
kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa - druhý ohřev	–	–	5,0	344,0	–	–

**Graf č. 4 Vliv hmotnosti kelímku na měření DSC (stejně navážky vzorků)**



Modře hliníkový kelímek (hmotnost vody = 19,480 mg)

Červeně kelímek, jehož těsnění odolává tlaku 10MPa

(hmotnost vody = 18,248 mg)

Podmínky měření:

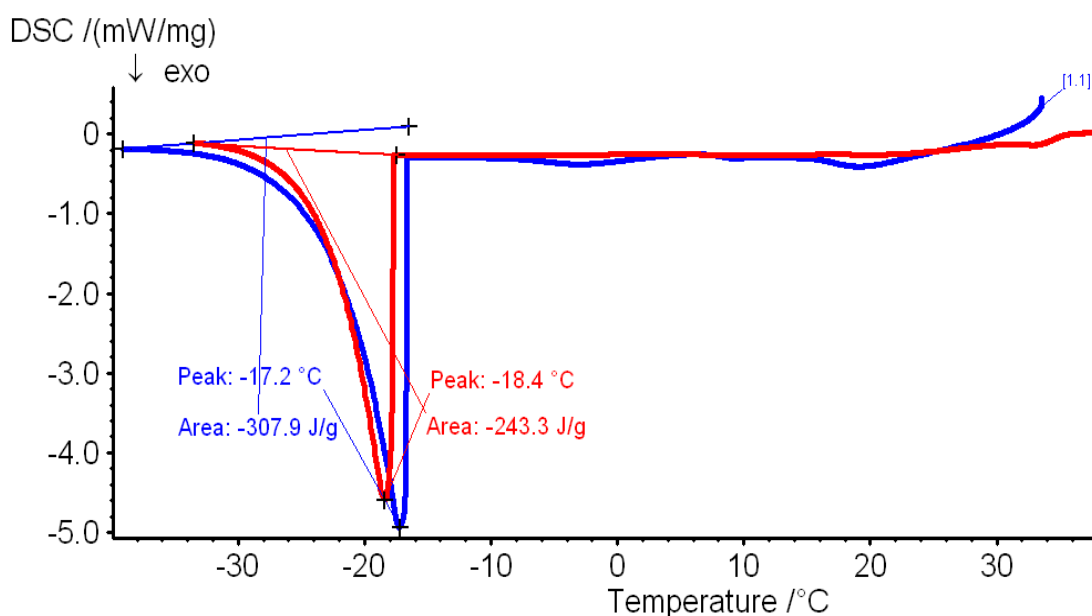
- počáteční teplota 20 °C
- chlazení na -60 °C (10 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 25 °C (5 °C/min)

**Tab. č. 4 Hodnoty fázových přechodů vody**

	rozdílné navážky		shodné navážky	
	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
ohřev				
Hliníkový	8,8	314,9	7,8	307,7
Těsnící	5,0	344,0	8,5	323,0
chlazení				
Hliníkový	-22,9	-238,1	-23,5	-238,1
Těsnící	-25,2	–	-25,2	–

### 5.1.2 ÚKOL Č. 2

**Graf č. 5a Záznam tris pufru s chlesterolsulfátem  
(rozdílné rychlosti chlazení)**



Červeně 1 °C/min

Modře 5 °C/min

#### Podmínky měření:

a) 1 °C/min:

počáteční teplota 39 °C

chlazení na – 40 °C (5 °C/min)

izoterma 2 minuty

ohřev na 40 °C (1 °C/min)

b) 5 °C/min:

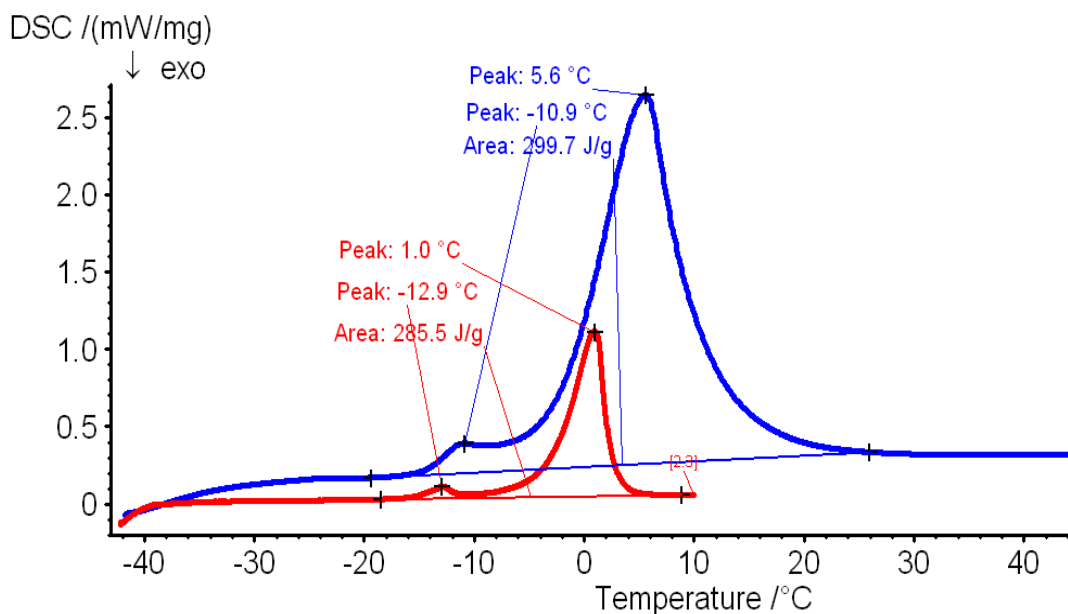
počáteční teplota 22 °C

chlazení na -40 °C (5 °C/min)

izoterma 2 minuty

ohřev na 40 °C (5 °C/min)

**Graf č. 5b Záznam tris pufru s chlesterolsulfátem  
(rozdílné rychlosti ohřevu)**



Červeně 1 °C/min

Modře 5 °C/min

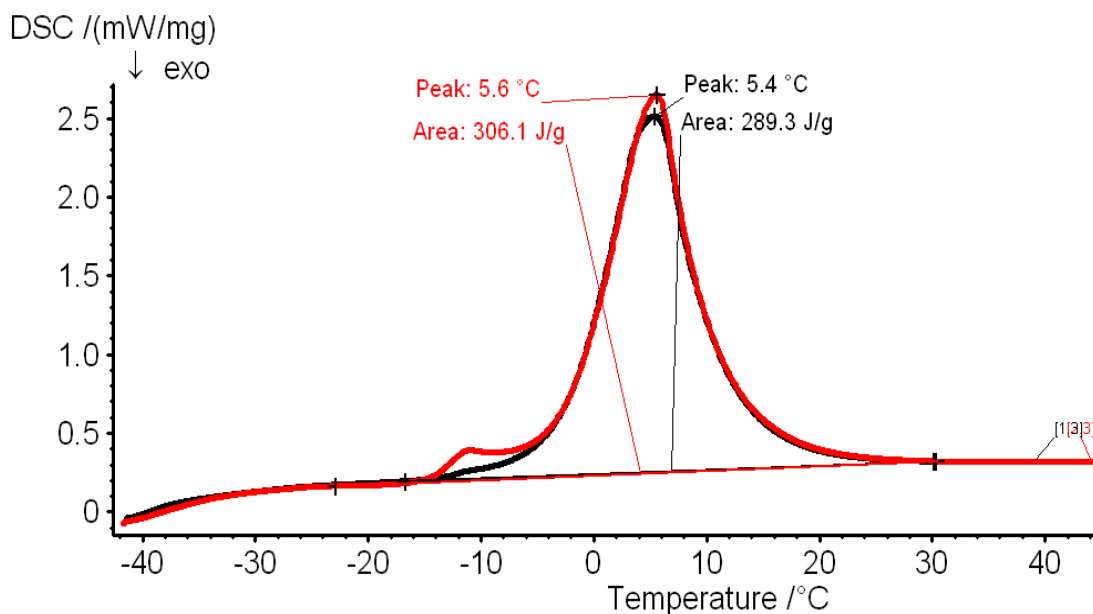
Podmínky měření:

- a) 1 °C/min: počáteční teplota 39 °C  
chlazení na – 40 °C (5 °C/min)  
izoterma 2 minuty  
ohřev na 40 °C (1 °C/min)
- b) 5 °C/min: počáteční teplota 22 °C  
chlazení na -40 °C (5 °C/min)  
izoterma 2 minuty  
ohřev na 40 °C (5 °C/min)

**Tab. č. 5 Hodnocení fázových přechodů tris pufru s cholesterosulfátem**

		$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
ohřev	1 °C/min	1,0	285,5
	5 °C/min	5,6	299,7
chlazení	1 °C/min	-18,4	-243,3
	5 °C/min	-17,2	-307,9

**Graf č.6a Porovnání záznamu tris pufru a tris pufru s cholesterolsulfátem (0,22%) - ohřev**



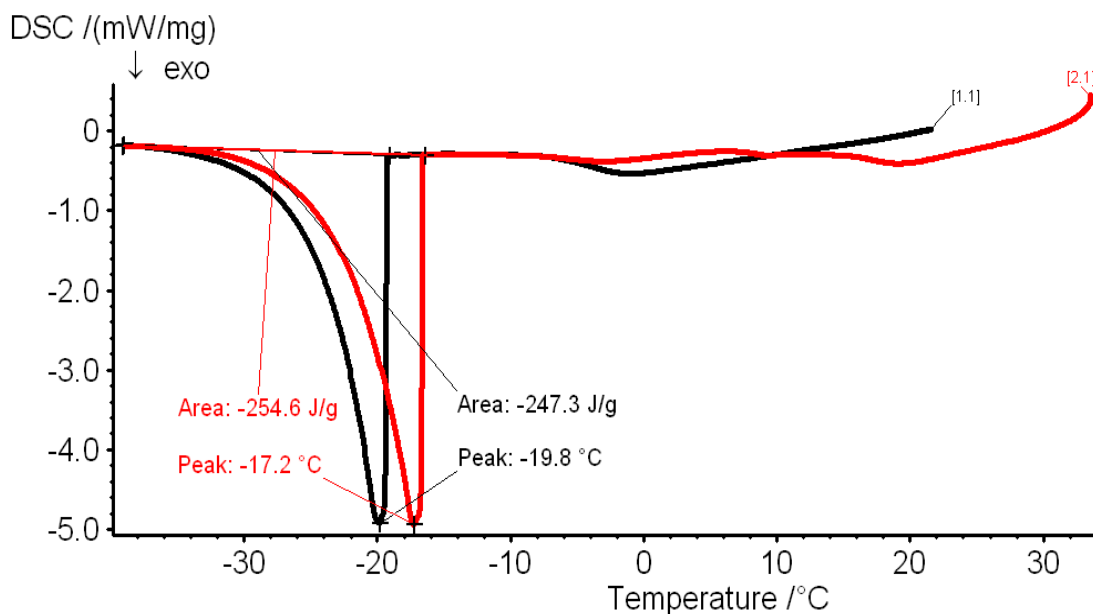
Černě tris pufr

Červeně tris pufr s cholesterolsulfátem

Podmínky měření:

- a) tris pufr: počáteční teplota 22 °C  
chlazení na -40 °C (5 °C/min)  
izoterma 2 minuty  
ohřev na 40 °C (5 °C/min)
- b) tris pufr s cholesterolsulfátem:  
počáteční teplota 33 °C  
chlazení na -40 °C (5 °C/min)  
izoterma 2 minuty  
ohřev na 45 °C (5 °C/min)

**Graf č.6b Porovnání záznamu tris pufru a tris pufru s cholesterolsulfátem  
(0,22%) - chlazení**



Černě tris pufr

Červeně tris pufr s cholesterolsulfátem

Podmínky měření:

a) tris pufr:

- počáteční teplota 22 °C
- chlazení na -40 °C (5 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 40 °C (5 °C/min)

b) tris pufr s cholesterolsulfátem:

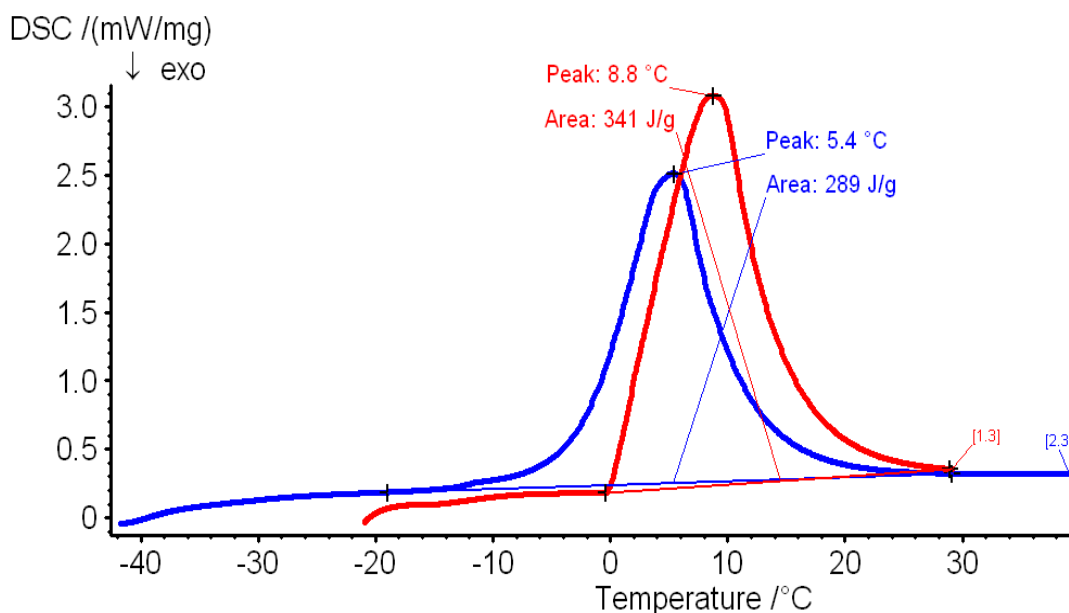
- počáteční teplota 33 °C
- chlazení na -40 °C (5 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 45 °C (5 °C/min)



**Tab. č. 6 Hodnocení fázových přechodů tris pufru a tris pufru s cholesterolsulfátem**

		$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
ohřev	Tris pufr	5,4	289,3
	tris pufr s cholesterolsulfátem	5,6	306,1
chlazení	Tris pufr	-19,8	-247,3
	tris pufr s cholesterolsulfátem	-17,2	-254,6

**Graf č.7a Porovnání záznamu voda a tris pufr - ohřev**



Červeně voda

Modře tris pufr

Podmínky měření:

a) voda: počáteční teplota 30 °C

chlazení na -20 °C (5 °C/min)

izoterma 3 minuty

ohřev na 30 °C (5 °C/min)

izoterma 5 minut

chlazení na -20 °C (5 °C/min)

izoterma 5 minut

ohřev na 100 °C (5 °C/min)

izoterma 2 minuty

chlazení na -20 °C (10 °C/min)

izoterma 5 minut

ohřev na 30 °C (5 °C/min)

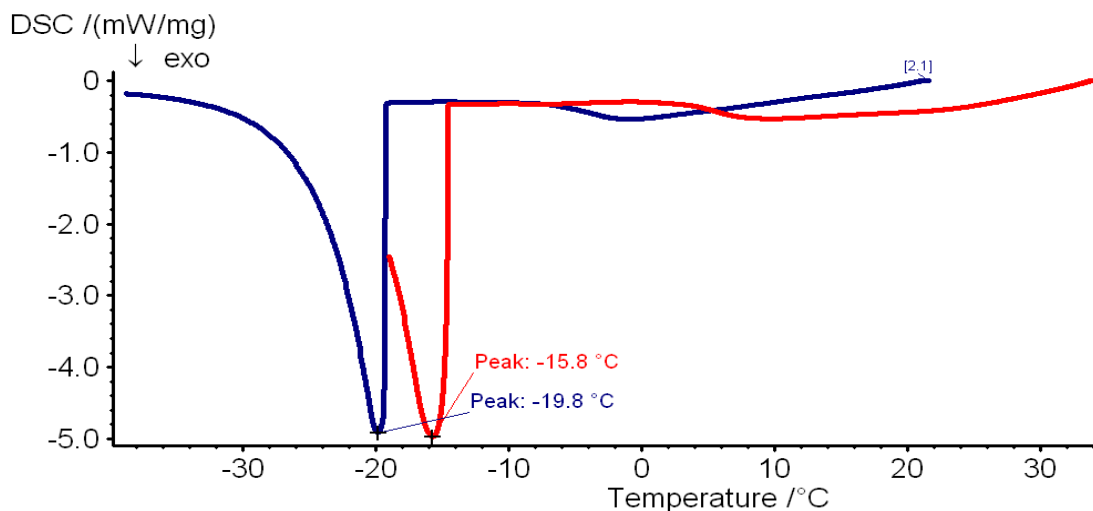
b) tris pufr: počáteční teplota 22 °C

chlazení na -40 °C (5 °C/min)

izoterma 2 minuty

ohřev na 40 °C (5 °C/min)

**Graf č.7b Porovnání záznamu voda a tris pufr – chlazení**



Červeně    voda  
Modře      tris pufr

Podmínky měření:

a) voda:

- počáteční teplota 30 °C
- chlazení na -20 °C (5 °C/min)
- izoterma 3 minuty
- ohřev na 30 °C (5 °C/min)
- izoterma 5 minut
- chlazení na -20 °C (5 °C/min)
- izoterma 5 minut
- ohřev na 100 °C (5 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- chlazení na -20 °C (10 °C/min)
- izoterma 5 minut
- ohřev na 30 °C (5 °C/min)

b) tris pufr:

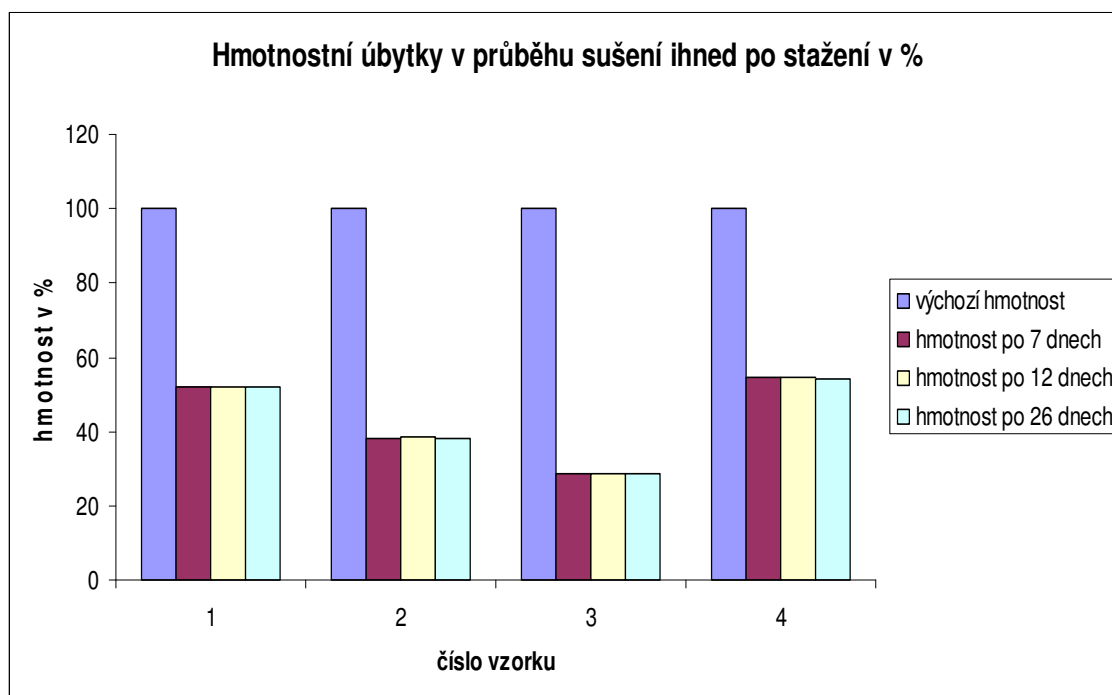
- počáteční teplota 22 °C
- chlazení na -40 °C (5 °C/min)
- izoterma 2 minuty
- ohřev na 40 °C (5 °C/min)

**Tab. č. 7 Hodnocení fázových přechodů vody a tris pufru**

		$T_p$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
ohřev	voda	8,8	341,0
	tris pufr	5,4	289,0
chlazení	voda	-15,8	–
	tris pufr	-19,8	–

### 5.1.3 ÚKOL Č. 3

**Graf č. 8 Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení ihned po stažení v %**



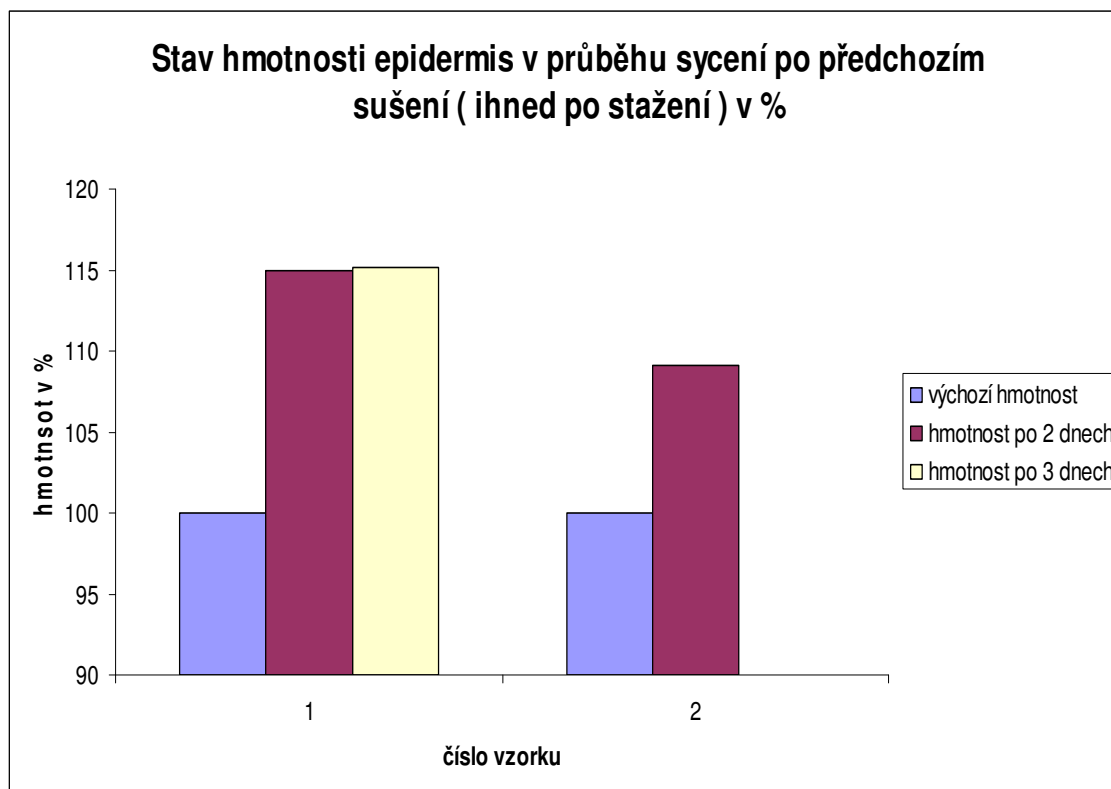
**Tab. č. 8 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení (ihned po stažení)**

Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení (ihned po stažení)				
číslo vzorku	hmotnost (g)			
	Výchozí	po 7 dnech	po 12 dnech	po 26 dnech
1	0,18295	0,08771	0,08763	0,08773
2	0,12983	0,08009	0,07997	0,08019
3	0,11318	0,08071	0,08072	0,08092
4	0,13846	0,06315	0,06306	0,06323

**Tab. č. 9 Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení  
(ihned po stažení)**

Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení (ihned po stažení)				
číslo vzorku	hmotnost (%)			
	výchozí	po 7 dnech	po 12 dnech	po 26 dnech
1	100	52,06	52,10	52,05
2	100	38,31	38,40	38,24
3	100	28,69	28,68	28,50
4	100	54,39	54,46	54,33
x		43,36	43,41	43,28
s		12,08	12,11	12,15
R		25,70	25,78	25,83

**Graf č. 9 Stav hmotnosti epidermis v průběhu sycení po předchozím sušení  
(ihned po stažení)**



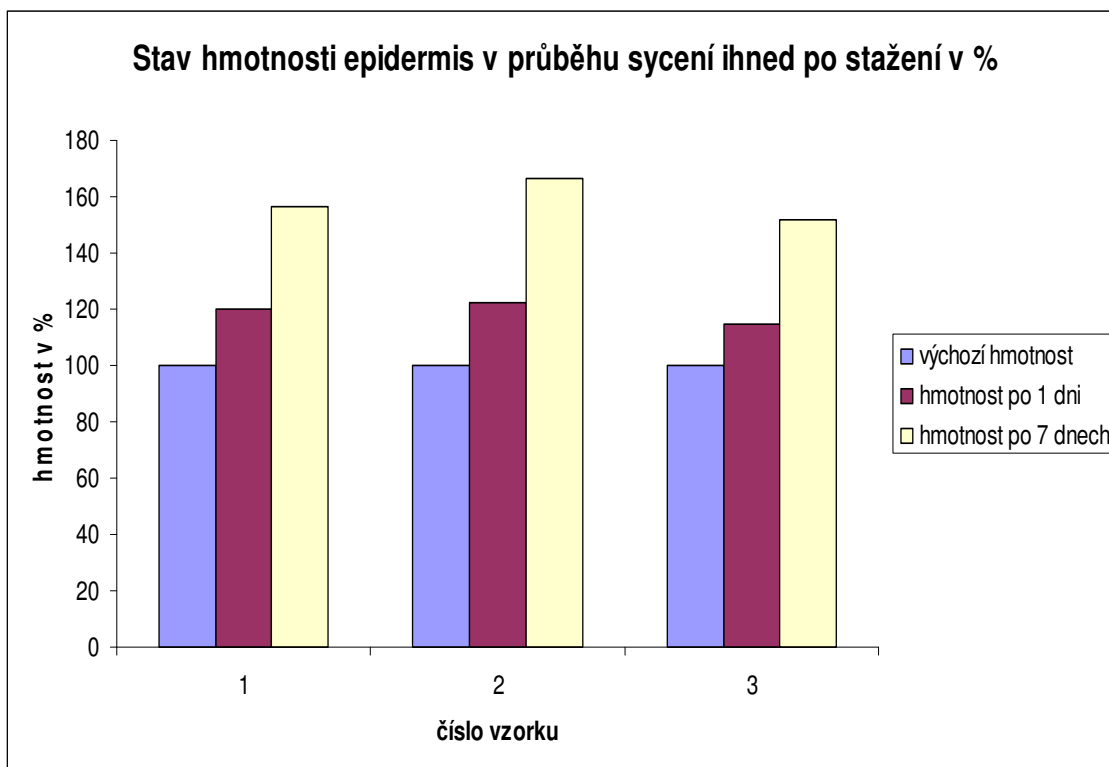
**Tab. č. 10 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení po předchozím sušení (ihned po stažení)**

Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení po předchozím sušení (ihned po stažení)			
číslo vzorku	hmotnost (g)		
	výchozí	po 2 dnech	po 3 dnech
1	0,08773	0,10089	0,10098
2	0,08019	0,08751	DSC

**Tab. č. 11 Stav hmotnosti epidermis v průběhu sycení po předchozím sušení (ihned po stažení)**

Stav hmotnosti epidermis v průběhu sycení po předchozím sušení (ihned po stažení)			
číslo vzorku	hmotnost (%)		
	výchozí	po 2 dnech	po 3 dnech
1	100	115,00	115,10
2	100	109,13	DSC

**Graf č. 10 Stav hmotnosti epidermis v průběhu sycení ihned po stažení v %**



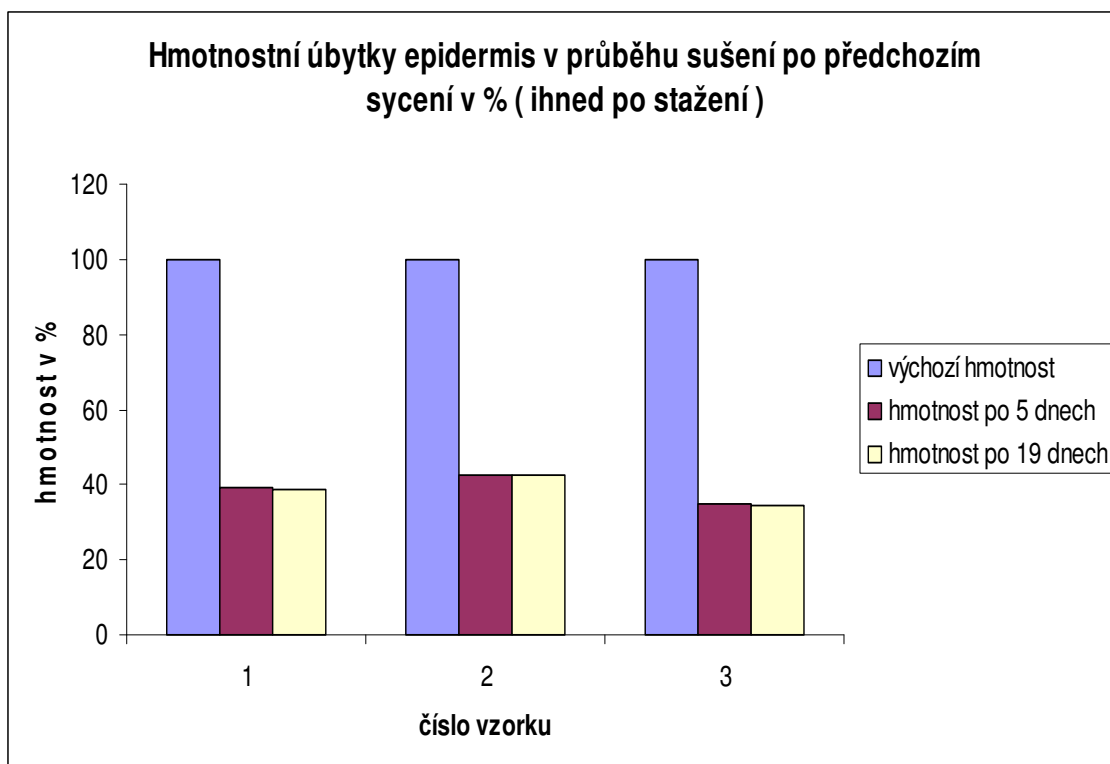
**Tab. č. 12 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení (ihned po stažení)**

Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení (ihned po stažení)			
číslo vzorku	hmotnost (g)		
	výchozí	po 1 dni	po 7 dnech
1	0,04919	0,05892	0,07704
2	0,04449	0,05437	0,07403
3	0,06169	0,07062	0,09348

**Tab. č. 13 Stav hmotnosti epidermis v průběhu sycení (ihned po stažení)**

Stav hmotnosti epidermis v průběhu sycení (ihned po stažení)			
číslo vzorku	hmotnost (%)		
	výchozí	po 1 dni	po 7 dnech
1	100	119,78	156,62
2	100	122,21	166,40
3	100	114,48	151,53
x		118,82	158,18
s		3,95	7,56
R		7,73	14,87

**Graf č. 11 Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení po předchozím sycení v % (ihned po stažení)**



**Tab. č. 14 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení po předchozím sycení (ihned po stažení)**

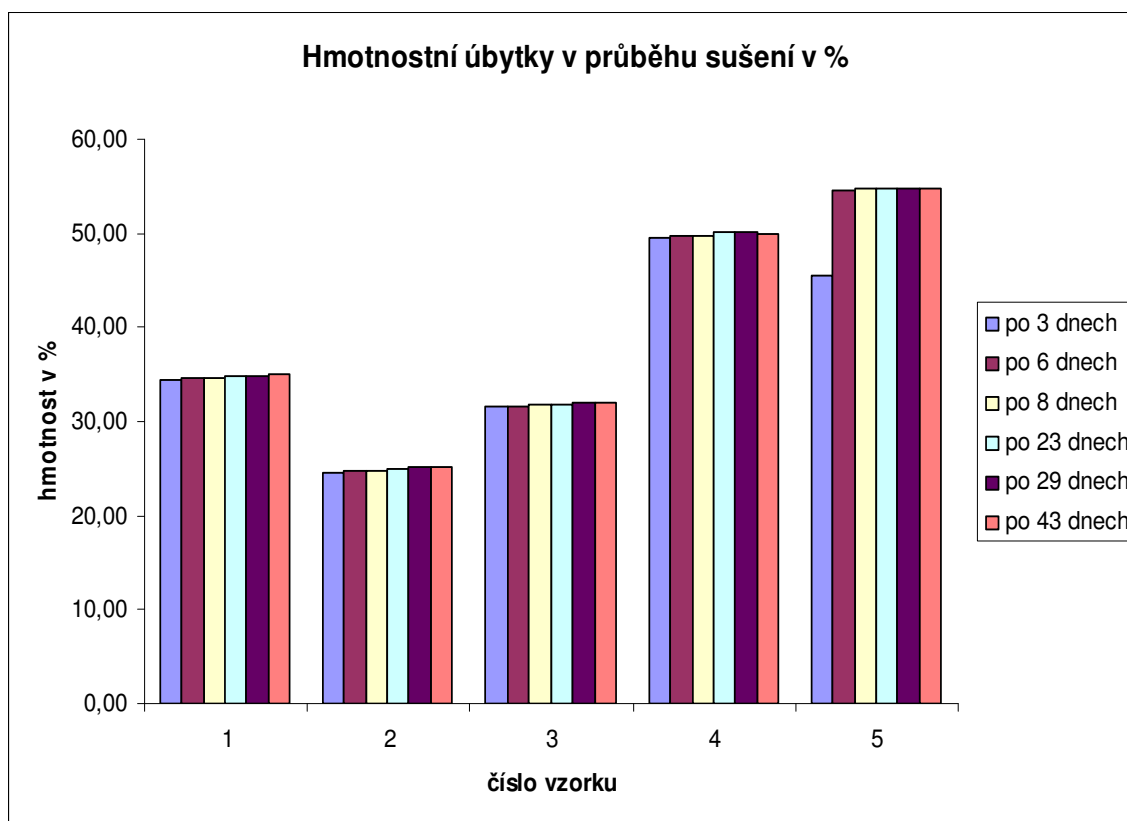
Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení po předchozím sycení (ihned po stažení)			
číslo vzorku	hmotnost (g)		
	výchozí	po 5 dnech	po 19 dnech
1	0,07704	0,04685	0,04705
2	0,07403	0,04241	0,04255
3	0,09348	0,06089	0,06116

**Tab. č. 15 Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení po předchozím sycení (ihned po stažení)**

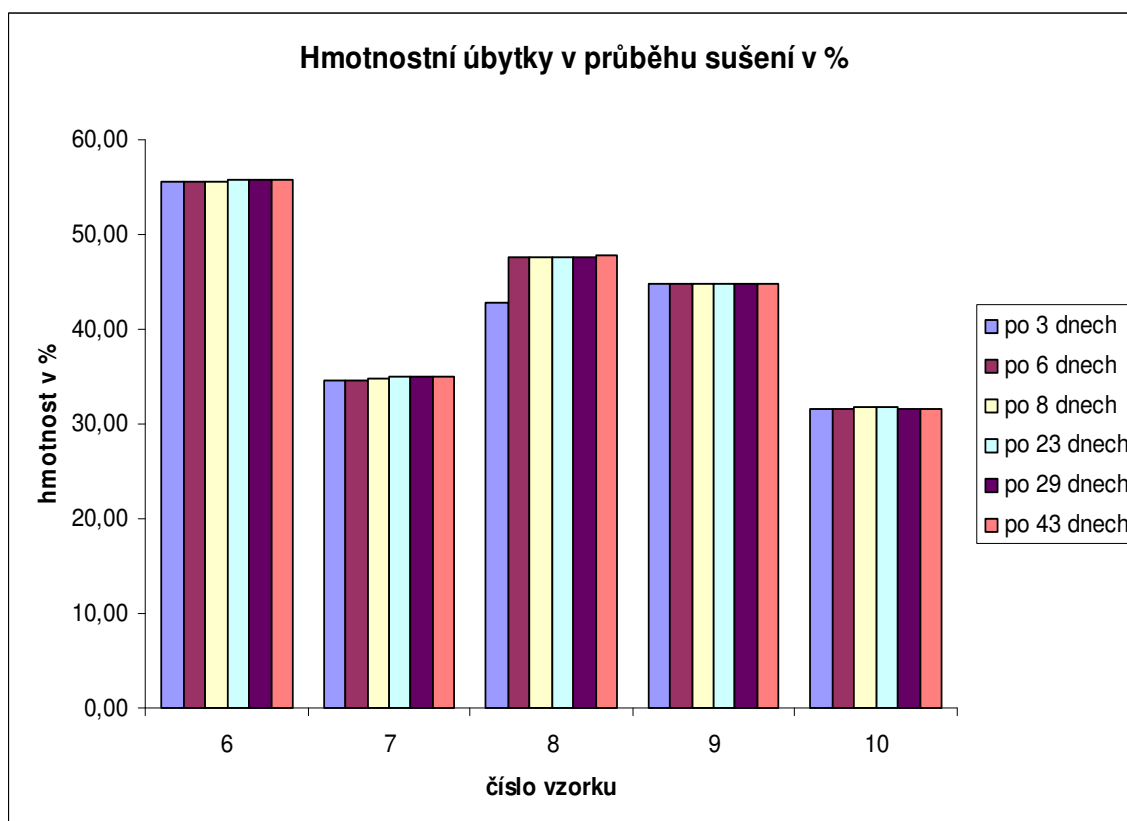
Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení po předchozím sycení (ihned po stažení)			
číslo vzorku	hmotnost (%)		
	výchozí	po 5 dnech	po 19 dnech
1	100	39,19	38,93
2	100	42,71	42,52
3	100	34,86	34,57
x		38,92	38,67
s		3,93	3,98
R		7,85	7,95



**Graf č. 12a Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení v % (-20 °C)**



**Graf č. 12b Hmotnostní úbytky epidermis v průběhu sušení v % (-20 °C)**



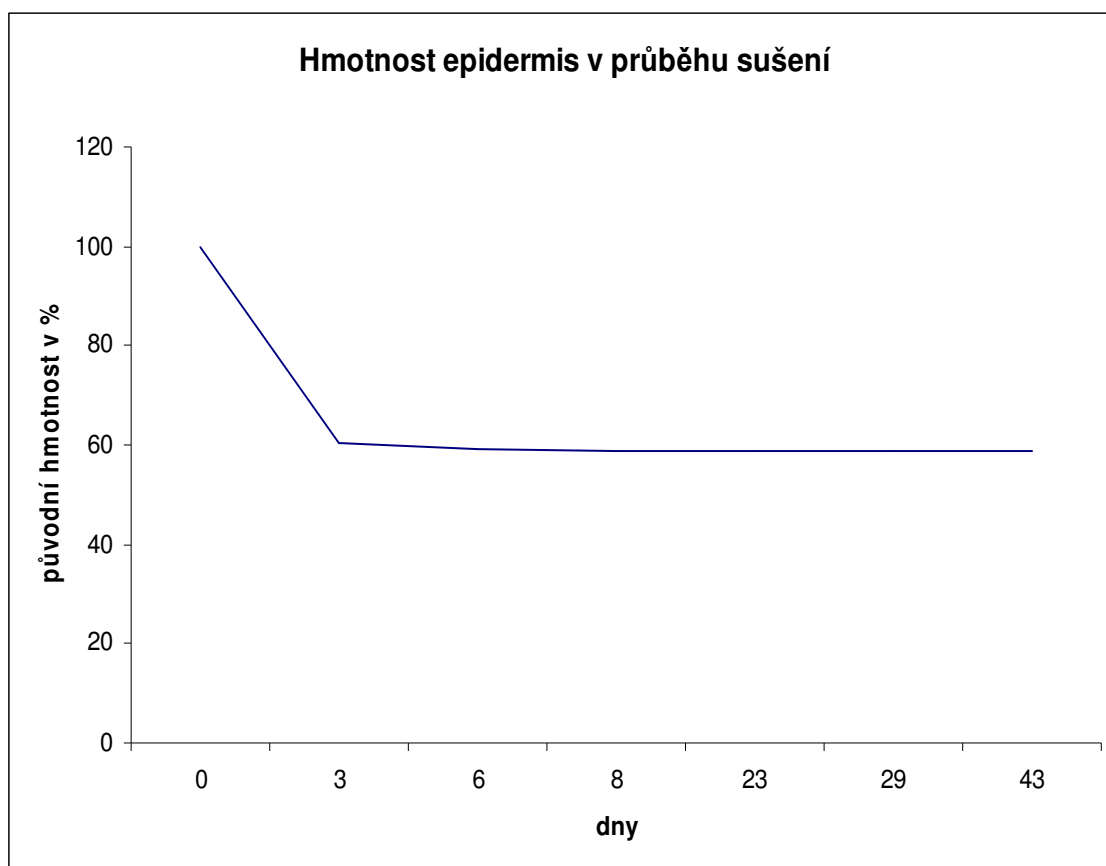
**Tab. č. 16 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení (-20 °C)**

Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení							
číslo vzorku	výchozí hmotnost (g)	hmotnost po 3 dnech (g)	hmotnost po 6 dnech (g)	hmotnost po 8 dnech (g)	hmotnost po 23 dnech (g)	hmotnost po 29 dnech (g)	hmotnost po 43 dnech (g)
1	0,10441	0,06836	0,06831	0,06817	0,06799	0,06801	0,06780
2	0,07158	0,05399	0,05381	0,05381	0,05364	0,05355	0,05352
3	0,10365	0,07097	0,07082	0,07071	0,07070	0,07049	0,07050
4	0,12858	0,06476	0,06464	0,06454	0,06418	0,06417	0,06433
5	0,11125	0,05062	0,05054	0,05036	0,05026	0,05024	0,05022
6	0,15514	0,06902	0,06896	0,06874	0,06854	0,06849	0,06851
7	0,11558	0,07550	0,07547	0,07531	0,07509	0,07518	0,07504
8	0,13565	0,07757	0,07106	0,07097	0,07105	0,07114	0,07089
9	0,18009	0,09932	0,09926	0,09926	0,09938	0,09933	0,09938
10	0,09257	0,06324	0,06324	0,06319	0,06312	0,06328	0,06324

**Tab. č. 17 Hmotnostní úbytky epidermis (v %) v průběhu sušení (-20 °C)**

Hmotnostní úbytky (v %) v průběhu sušení (počáteční hmotnost epidermis = 100%)						
po dnech						
číslo vzorku	3	6	8	23	29	43
1	34,53	34,58	34,71	34,89	34,86	35,06
2	24,57	24,83	24,83	25,06	25,19	25,23
3	31,53	31,67	31,78	31,79	31,99	31,98
4	49,63	49,73	49,81	50,09	50,09	49,97
5	45,50	54,57	54,73	54,82	54,84	54,86
6	55,51	55,55	55,69	55,82	55,85	55,83
7	34,68	34,70	34,84	35,03	34,95	35,08
8	42,82	47,62	47,68	47,62	47,56	47,74
9	44,85	44,86	44,88	44,82	44,84	44,82
10	31,68	31,68	31,74	31,81	31,64	31,68
X	39,53	40,98	41,07	41,18	41,18	41,23
S	9,60	10,79	10,81	10,79	10,78	10,75
R	30,94	30,72	30,86	30,76	30,66	30,60

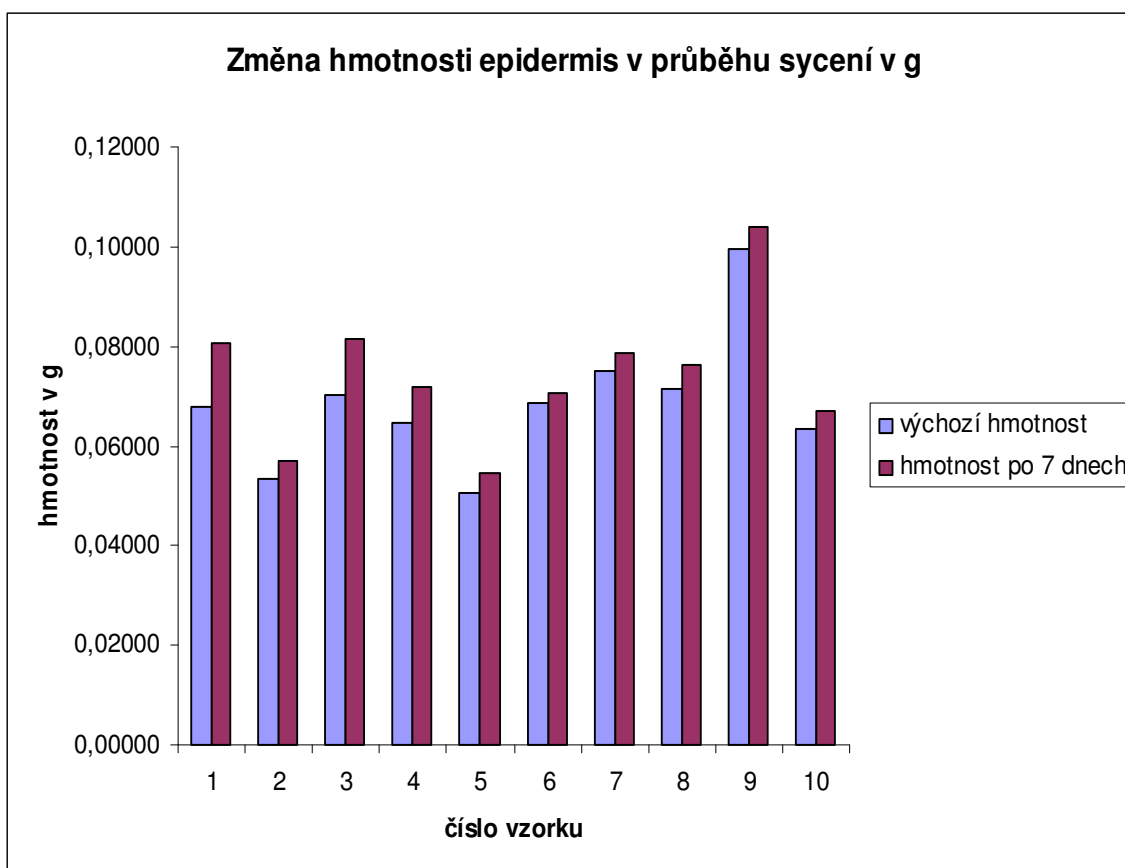
**Graf č. 13 Hmotnost epidermis v průběhu sušení (-20 °C)**



**Tab. č. 18 Hmotnost epidermis (původní hodnoty)  
v průběhu sušení (-20 °C)**

Hmotnost epidermis (původní hodnoty) v průběhu sušení							
po dnech							
	0	3	6	8	23	29	43
původní hmotnost v %	100	60,47	59,02	58,93	58,82	58,82	58,77

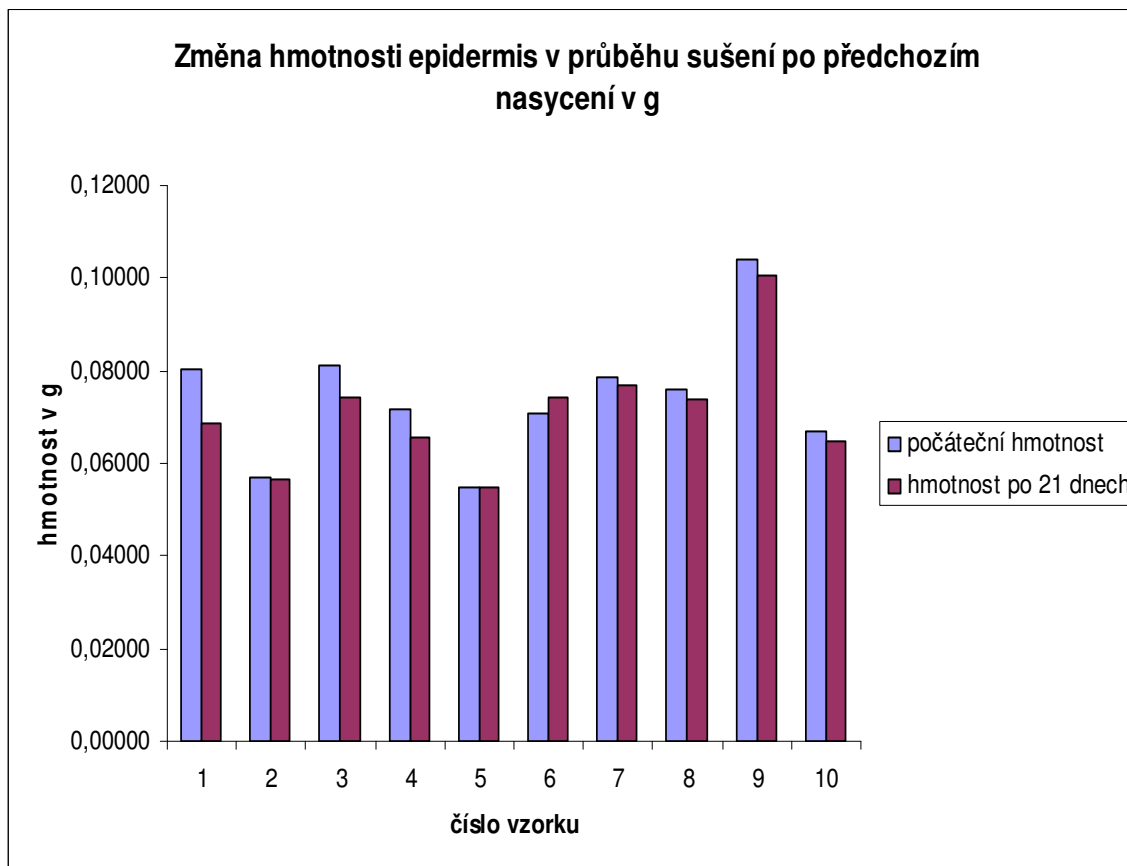
**Graf č. 14 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení v g (-20 °C)**



**Tab. č. 19 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení po předchozím sušení (-20 °C)**

Změna hmotnosti epidermis v průběhu sycení			
číslo vzorku	výchozí hmotnost (g)	hmotnost po 7 dnech (g)	hmotnostní přírůstek (%)
1	0,06798	0,08050	18,42
2	0,05356	0,05699	6,40
3	0,07033	0,08134	15,65
4	0,06447	0,07171	11,23
5	0,05038	0,05469	8,55
6	0,06861	0,07083	3,24
7	0,07517	0,07862	4,59
8	0,07125	0,07606	6,75
9	0,09959	0,10396	4,39
10	0,06328	0,06701	5,89
x	–	–	8,51

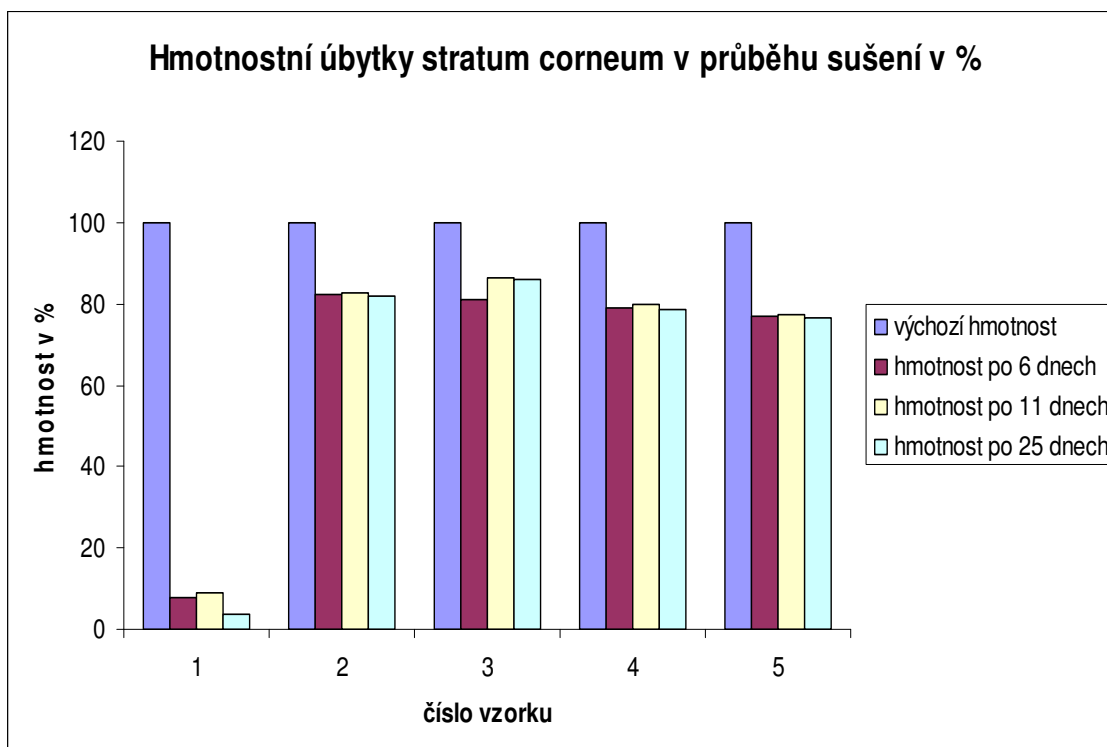
**Graf č. 15 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení po předchozím nasycení v g (-20 °C)**



**Tab. č. 20 Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení po předchozím nasycení (-20 °C)**

Změna hmotnosti epidermis v průběhu sušení po předchozím nasycení			
číslo vzorku	počáteční hmotnost (g)	hmotnost po 21 dnech (g)	změna hmotnosti (%)
1	0,08050	0,06848	- 14,93
2	0,05699	0,05670	- 0,51
3	0,08134	0,07434	- 8,61
4	0,07171	0,06573	- 8,40
5	0,05469	0,05477	+ 0,15
6	0,07083	0,07443	+ 5,08
7	0,07862	0,07675	- 2,38
8	0,07606	0,07367	- 3,14
9	0,10396	0,10068	- 3,16
10	0,06701	0,06486	+ 3,21

**Graf č. 16 Hmotnostní úbytky stratum corneum v průběhu sušení v %**



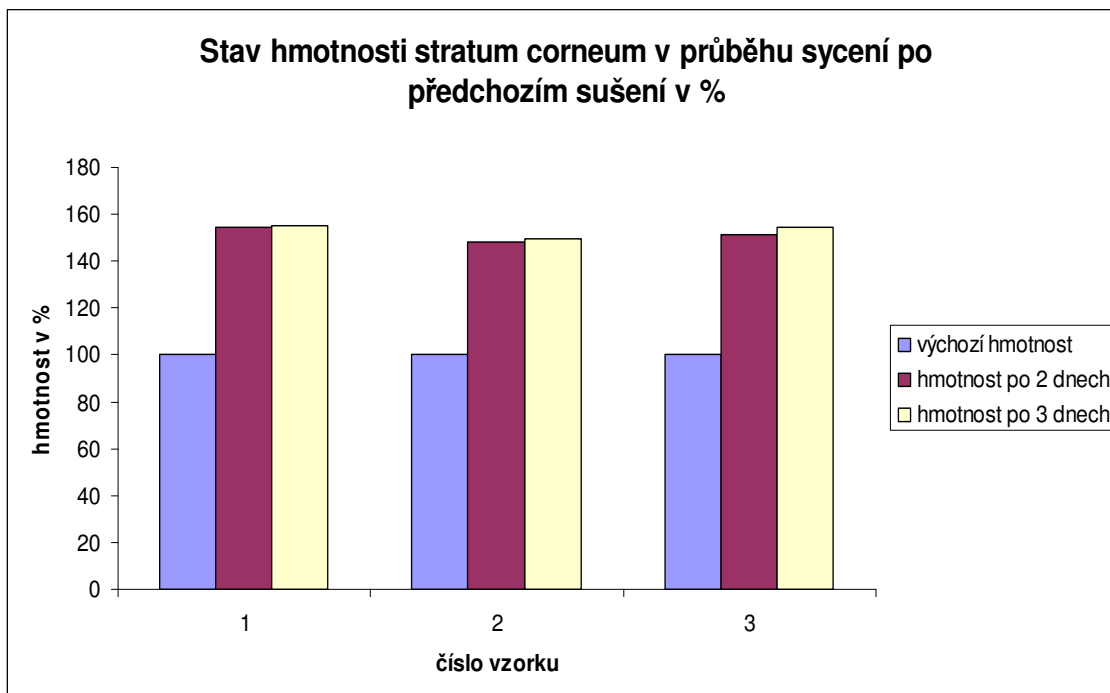
**Tab. č. 21 Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sušení**

Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sušení				
číslo vzorku	hmotnost (g)			
	výchozí	po 6 dnech	po 11 dnech	po 25 dnech
1	0,01086	0,01003	0,00990	0,01044
2	0,05098	0,00895	0,00875	0,00916
3	0,02599	0,00488	0,00348	0,00367
4	0,01773	0,00374	0,00360	0,00377
5	0,02624	0,00605	0,00593	0,00614

**Tab. č. 22 Hmotnostní úbytky stratum corneum v průběhu sušení**

Hmotnostní úbytky stratum corneum v průběhu sušení				
číslo vzorku	hmotnost (%)			
	výchozí	po 6 dnech	po 11 dnech	po 25 dnech
1	100	7,64	8,84	3,87
2	100	82,44	82,84	82,03
3	100	81,22	86,61	85,88
4	100	78,90	79,70	78,74
5	100	76,94	77,40	76,60
x		64,43	60,08	65,42
s		32,37	32,74	34,59
R		74,80	77,77	82,01

**Graf č. 17 Stav hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení po předchozím sušení v %**



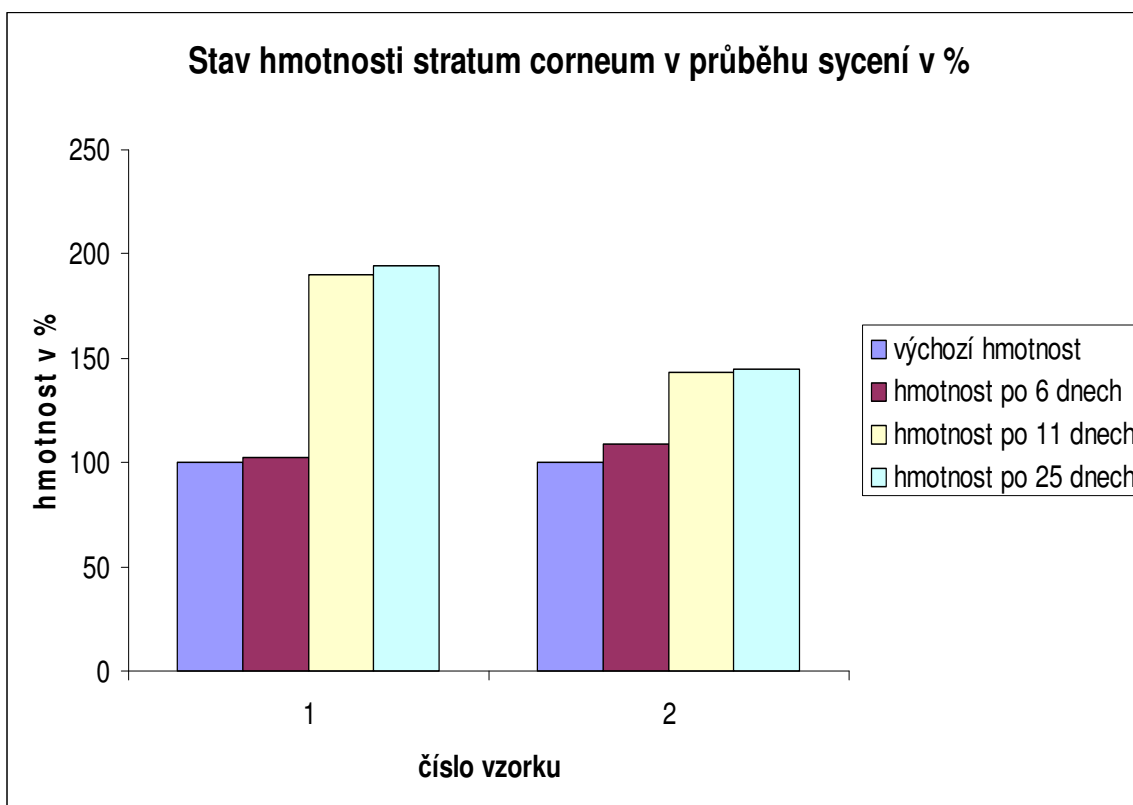
**Tab. č. 23 Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení po předchozím sušení**

Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení po předchozím sušení			
číslo vzorku	hmotnost (g)		
	výchozí	po 2 dnech	po 3 dnech
1	0,01044	0,01612	0,01620
2	0,00916	0,01357	0,01371
3	0,00367	0,00555	0,00566

**Tab. č. 24 Stav hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení po předchozím sušení**

Stav hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení po předchozím sušení			
číslo vzorku	hmotnost (%)		
	výchozí	po 2 dnech	po 3 dnech
1	100	154,41	155,17
2	100	148,14	149,67
3	100	151,23	154,22
x		151,26	153,02
s		3,14	2,94
R		6,27	5,50

**Graf č. 18 Stav hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení v %**



**Tab. č. 25 Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení**

Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení				
číslo vzorku	hmotnost (g)			
	výchozí	po 6 dnech	po 11 dnech	po 25 dnech
1	0,00764	0,00781	0,01450	0,01455
2	0,00995	0,01083	0,01426	0,01441

**Tab. č. 26 Stav hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení**

Stav hmotnosti stratum corneum v průběhu sycení				
číslo vzorku	hmotnost (%)			
	výchozí	po 6 dnech	po 11 dnech	po 25 dnech
1	100	102,23	189,79	194,45
2	100	108,84	143,32	144,82
x		105,54	166,56	167,64



**Tab. č. 27 Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sušení po předchozím sycení**

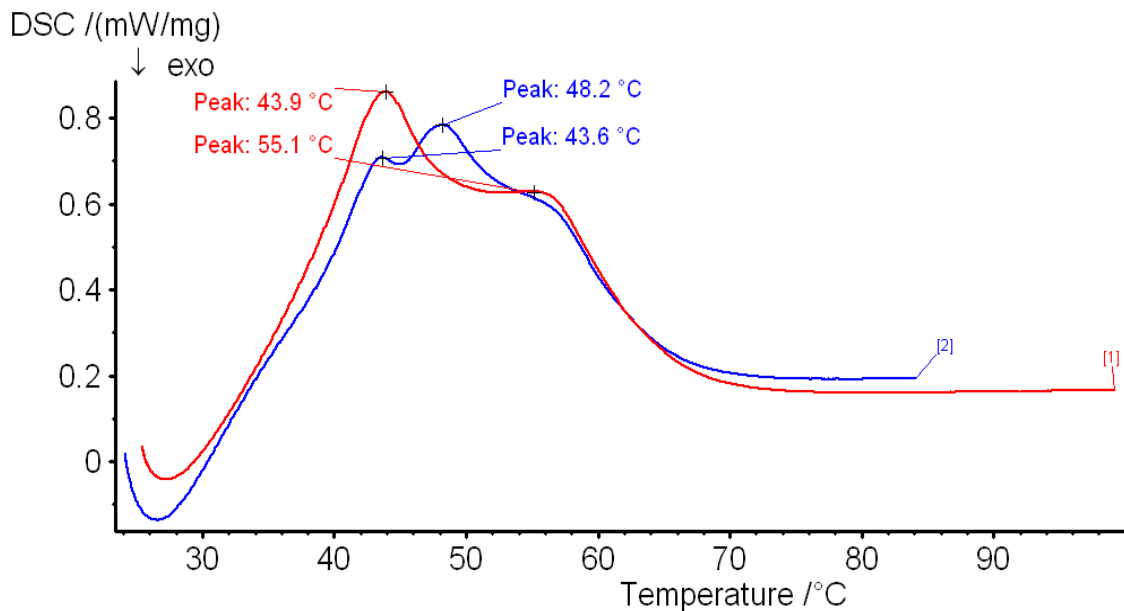
Změna hmotnosti stratum corneum v průběhu sušení po předchozím sycení			
číslo vzorku	hmotnost (g)		
	výchozí	po 2 dnech	po 3 dnech
1	0,01455	0,00491	0,00479
2	0,01441	0,00634	0,00626

**Tab. č. 28 Úbytek hmotnosti stratum corneum v průběhu sušení po předchozím sycení**

Úbytek hmotnosti stratum corneum v průběhu sušení po předchozím sycení			
číslo vzorku	hmotnost (%)		
	výchozí	po 2 dnech	po 3 dnech
1	100	66,25	67,08
2	100	56,00	56,56
x		61,13	61,82

#### 5.1.4 ÚKOL Č. 4

**Graf č. 19 Porovnání záznamu cetylalkohol + cera alba a cetylalkohol + cera alba + voda**



Červeně cetylalkohol + cera alba

Modře cetylalkohol + cera alba + voda

Podmínky měření:

1. cetylalkohol + cera alba: počáteční teplota 25 °C  
ohřev na 100 °C (5 °C/min)
2. cetylalkohol + cera alba + voda: počáteční teplota 24 °C  
ohřev na 85 °C (5 °C/min)

DSC thermograms of poly(2-vinylpyridine) (P2VP) showing two heating cycles. The y-axis is DSC heat flow in mW/mg, with 'exo' (exothermic) pointing downwards. The x-axis is Temperature in °C from -40 to 100. The red curve (1) shows peaks at 43.3 °C and 54.9 °C. The blue curve (2) shows peaks at 48.2 °C and 43.6 °C. Both curves show a glass transition around 0 °C and a large endothermic peak around 45-50 °C.

Modře            cetylalkohol + cera alba + voda

1. cetylalkohol + cera alba + voda po zmražení: počáteční teplota - 37 °C  
ohřev na 100 °C (5 °C/min)
2. cetylalkohol + cera alba + voda: počáteční teplota 24 °C  
ohřev na 85 °C (5 °C/min)

## **6 DISKUZE**

## K pracovnímu úkolu č. 1

Pro měření jsme použily kelímky, jejichž těsnění odolává tlaku 10MPa. Vzorek obsahující vodu jsme podrobily opakovanému chlazení do  $-60^{\circ}\text{C}$  a ohřevu do  $110^{\circ}\text{C}$  a sledovaly jsme, zda dochází k úniku vody mimo kelímek. Záznam měření je na grafu č. 1. Hodnocení fázových přechodů je uvedeno v tabulce č. 1. Na základě porovnání hodnot  $\Delta H$  opakovaných měření můžeme konstatovat, že za daných podmínek měření nedochází k úniku vody z kelímku. Všechny posuzované hodnoty  $T_p$  a  $\Delta H$  jsou dobře vyhodnotitelné a vyznačují se minimální variabilitou. Nebyl zaznamenán fázový přechod vody z kapalného skupenství do plynného.

V následující fázi jsme se tedy zaměřily na přechod kapaliny v páru. Vzorek jsme ochladily tak, aby došlo k přeměně kapalně vody na led a při následném ohřevu pak k přeměně na kapalinu, eventuálně při vyšších teplotách na páru. Toto uspořádání jsme zvolily proto, abychom měly důkaz vody v kelímku. Ani v tomto případě, při ohřevu na  $160^{\circ}\text{C}$  (graf č. 2a) nebyla zaznamenána fázová přeměna kapaliny na páru.

Následující chlazení do minusových hodnot a ohřev do  $25^{\circ}\text{C}$  (graf č. 2b) je důkazem, že voda ve formě páry z kelímku neunikla.

Používané kelímky odolávající vnitřnímu tlaku 10MPa se vyznačují tím, že ve srovnání s klasickým hliníkovým kelímkem mají hmotnost asi 20krát vyšší. Dále jsme se proto zajímaly, do jaké míry může tato vyšší hmotnost ovlivnit výsledky měření. Na grafu č. 3 jsou porovnány záznamy vzorku umístěného v různých kelímcích. Provedly jsme chlazení vzorku do  $-60^{\circ}\text{C}$  a následný ohřev do  $25^{\circ}\text{C}$  rychlostí  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Následující druhý ohřev probíhal při rychlosti  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Mimo grafu jsou hodnoty uvedeny i v tabulce č. 3a a 3b.

Z výsledků vyplývá, že zanedbatelné rozdíly jsou v hodnotách  $T_o$ , vyšší rozdíly jsou u hodnot  $T_p$ , přičemž se stoupající rychlostí ohřevu se zvyšuje rozdíl v hodnotách závislosti na druhu kelímku (při rychlosti ohřevu  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  je rozdíl  $3,8^{\circ}\text{C}$  a při rychlosti ohřevu  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  činí rozdíl již  $5,1^{\circ}\text{C}$ ).

Pro eliminaci vlivu rozdílné hmotnosti navážky vzorku jsme provedly ještě jedno měření se stejnými hmotnostmi vzorku. Záznam je na grafu č. 4. Ze záznamů vyplývá, že rozdíly při stejné hmotnosti vzorků vody jsou menší.

## K pracovnímu úkolu č. 2

Vzorek obsahující cholesterolsulfát rozpuštěný v tris pufru byl podroben chlazení a ohřevu při různých rychlostech. Při tepelných změnách vzorku během chlazení s následným ohřevem rychlostí 1 °C/min se pík objevil při -18,4 °C; během chlazení s následným ohřevem rychlostí 5 °C/min byl pík při -17,2 °C. Plochy píků se od sebe vzájemně významně rovněž příliš nelišily:  $\Delta H = -243,3 \text{ J/g}$  (během chlazení s následným ohřevem rychlostí 1 °C/min),  $\Delta H = -307,9 \text{ J/g}$  (během chlazení s následným ohřevem rychlostí 5 °C/min) (graf č. 5a). Během ohřevu se objevily 2 píky při rychlosti 1 °C/min i při 5 °C/min. V průběhu ohřevu rychlostí 1 °C/min to bylo při -12,9 °C a při 1,0 °C; rychlostí 5 °C/min při -10,9 °C a 5,6 °C. Plochy píků byly srovnatelné (1 °C/min a 1,0 °C:  $\Delta H = 285,5 \text{ J/g}$ ; 5 °C/min a 5,6 °C:  $\Delta H = 299,7 \text{ J/g}$ ) (graf č. 5b a tab.č. 5). Z výsledků měření vyplývá, že rychlost ohřevu má na výsledné hodnoty  $\Delta H$  malý vliv.

V další fázi byl porovnáván záznam tris pufru a tris pufru s cholesterolsulfátem (0,22%). Během ohřevu se píky objevily téměř při shodné teplotě; tris pufr – pík = 5,4 °C ( $\Delta H = 289,3 \text{ J/g}$ ), tris pufr s cholesterolsulfátem – pík = 5,6 °C ( $\Delta H = 306,1 \text{ J/g}$ ) (graf č. 6a). Vzorky nabyly v průběhu chlazení těchto hodnot: - tris pufr: pík = -19,8 °C,  $\Delta H = -247,3 \text{ J/g}$  - tris pufr s cholesterolsulfátem: pík = -17,2 °C,  $\Delta H = -254,6 \text{ J/g}$  (graf č. 6b, tab.č. 6). Z toho plyne, že cholesterolsulfát jen málo ovlivňuje výsledky měření.

Nakonec je uvedeno srovnání záznamu vody a tris pufru. V průběhu ohřevu se u vody pík objevil při 8,8 °C ( $\Delta H = 341,0 \text{ J/g}$ ), u tris pufru při 5,4 °C ( $\Delta H = 289,0 \text{ J/g}$ ) (graf č. 7a). Během chlazení se u vody pík ukázal při 15,8 °C a u tris pufru při -19,8 °C. Plochy píků jsou v těchto případech nevyhodnotitelné (graf č. 7b, tab.č. 7).

## K pracovnímu úkolu č. 3

Úkol je zaměřen na porovnání přírůstků a úbytků hmotnosti 1) epidermis a 2) stratum corneum v průběhu sycení a sušení.

Ad 1) Srovnávána je epidermis získaná ihned po stažení a epidermis uchovávaná 10 dní v mrazničce při teplotě -20 °C. Epidermis získaná ihned po stažení byla podrobena sušení v exsikátoru se Silikagelem a vážená po 7 dnech, po 12 dnech a po 26 dnech; epidermis uchovávaná při -20 °C

po 3 dnech, po 6 dnech, po 8 dnech, po 23 dnech, po 29 dnech a po 43 dnech. Z výsledků měření vyplývá, že epidermis dosáhla konstantní hmotnosti po 7 dnech (epidermis ihned po stažení, tab.č. 8, graf č.8), resp. po 3 dnech (epidermis uchovávaná při  $-20^{\circ}\text{C}$ , tab.č. 16, graf č.13 a č.12a a 12b). Pak se již hmotnost měnila nepatrně. Hmotnostní úbytek činil průměrně 43,36% (epidermis ihned po stažení, tab.č. 9), resp. 39,53% (epidermis uchovávaná při  $-20^{\circ}\text{C}$ , tab.č. 17 a č.18).

Po sušení do konstantní hmotnosti byla epidermis sycena v exsikátoru nasyceným roztokem  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (tento roztok vytvoří relativní vlhkost 90%). Epidermis získaná ihned po stažení získala konstantní hmotnost po 3 dnech (tab.č.10), přírůstek činil po 2 dnech průměrně 12,07% (tab.č. 11, graf č.9). Epidermis uchovávaná při  $-20^{\circ}\text{C}$  byla zvážena teprve po 7 dnech, kdy už se začala projevovat hniloba, proto byla podrobena sušení v exsikátoru se Silikagelem. V průběhu sycení se hmotnost epidermis zvýšila průměrně o 8,51% (tab.č. 19, graf č.14).

Po sycení následovalo opět sušení v exsikátoru se Silikagelem. Epidermis uchovávaná při  $-20^{\circ}\text{C}$  byla zvážena až po 21 dnech, kdy se sušení ukončilo, protože během této doby poklesla hmotnost epidermis na nižší hodnotu, než jaká byla hmotnost na počátku sušení (po vzetí z mrazničky a vložení do exsikátoru se Silikagelem; tab.č. 16 – výchozí hmotnost vs. tab.č. 20(k ní patří graf č.15)- hmotnost po 21 dnech). Průměrný hmotnostní úbytek činil 3,27% vzhledem k hmotnosti na počátku sušení po předchozím sycení.

Epidermis získaná ihned po stažení nebyla dalšímu sušení podrobena. Epidermis uchovávaná při  $-20^{\circ}\text{C}$  byla podrobena pouze počátečnímu sušení, proto nemohou být porovnány hmotnostní přírůstky v průběhu sycení epidermis ihned po stažení a epidermis uchovávané při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Epidermis ihned po stažení se vložila do exsikátoru se  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a byla vážena po 1 dni a po 7 dnech (tab.č.12). Po 7 dnech ale epidermis začala vykazovat známky hniloby, proto bylo sycení ukončeno. Během této doby zvýšila epidermis svou hmotnost průměrně o 58,18% (tab.č. 13, graf č.10). Tato epidermis byla znovu sušena v exsikátoru se Silikagelem. Epidermis byla v průběhu sušení vážena po 5 dnech a po 19 dnech. Z tab.č. 15 (s ní souvisí i tab.č.14 a graf č.11) je zřejmé, že konstantní hmotnosti bylo dosaženo již po 5 dnech, poté se hmotnost již

výrazně neměnila. Během této doby poklesla hmotnost epidermis průměrně o 38,92%.

- Ad 2) Část stratum corneum byla po získání: a) ihned sušena  
b) ihned sycena

ad a) Sušení probíhalo v exsikátoru se Silikagelem. Hmotnost byla vážena na počátku sušení, po 6 dnech, po 11 dnech a po 25 dnech (tab.č.21). Hmotnostní úbytek činil po 6 dnech průměrně 64,43%, po 11 dnech 60,08% a po 25 dnech 65,42% (tab.č. 22, graf č.16). Z toho plyne, že hmotnost se již po 6 dnech výrazně neměnila a můžeme tedy říci, že stratum corneum dosáhlo konstantní hmotnosti po 6 dnech.

Po sušení následovalo sycení v exsikátoru se  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Hmotnost byla zaznamenána na počátku sycení, po 2 dnech a po 3 dnech. Rozdíl v hmotnosti po 2 dnech a po 3 dnech je nepatrný (tab.č. 23), proto lze říci, že během sycení dosáhlo stratum corneum konstantní hmotnosti již po 2 dnech, kdy hmotnostní přírůstek činil průměrně 51,26% (tab.č. 24, graf č.17).

ad b) Sycení probíhalo v exsikátoru se  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Stratum corneum bylo váženo na začátku sycení po 6 dnech, po 11 dnech a po 25 dnech. Rozdíl hmotnostních přírůstků po 11 dnech a po 25 dnech je u vzorku č. 2 nepatrný, u vzorku č. 1 činil přírůstek 4,66% (tab.č. 26). Obecně lze ale konstatovat, že se hmotnost ustálila na konstantní hodnotě po 11 dnech (tab.č. 25), kdy hmotnostní přírůstek byl průměrně 66,56% (tab.č. 26, graf č.18).

Po sycení následovalo sušení. Stratum corneum bylo váženo na počátku sycení, po 2 dnech a po 3 dnech, kdy se již hmotnost výrazně nezměnila (tab.č. 27), proto bylo sušení ukončeno. Hmotnostní úbytek činil po 2 dnech průměrně 61,13% (tab.č. 28).

#### **K pracovnímu úkolu č. 4**

Během pokusu byla porovnávána směs cetylalkohol + cera alba a cetylalkohol + cera alba + voda. Vzorky byly podrobeny zahřívání z počáteční teploty 25 °C, resp. 24 °C na 100 °C, resp. na 85 °C rychlostí 5 °C/min. Na záznamu DSC se u směsi bez vody i s vodou objevily dva píky, tudíž voda nemá na počet píků vliv. Směs cetylalkohol + cera alba měla na záznamu DSC píky při teplotě 43,6 °C a 48,2 °C; směs cetylalkohol + cera alba + voda při teplotě 43,9 °C a 55,1 °C (graf č. 19). Z toho vyplývá, že první píky se objevily téměř při stejné



teplotě, teploty u druhých píků se lišily o 6,9 °C (pík u směsi s vodou se objevil až při teplotě 55,1 °C).

Dále byla porovnávána směs cetylalkohol + cera alba + voda (směs č. 1) a cetylalkohol + cera alba + voda po zmražení (směs č. 2). Směs cetylalkohol + cera alba + voda byla zahřívána z teploty 24 °C na 85 °C a směs cetylalkohol + cera alba + voda po zmražení z teploty -37 °C na 100 °C rychlostí 5 °C/min. Opět se objevily dva píky. U směsi č. 1 při teplotách 43,6 °C a 48,2 °C, u směsi č. 2 při teplotách 43,3 °C a 54,9 °C (graf č. 20). Teploty u prvních píků byly téměř srovnatelné, teploty u druhých píků se lišily již o 6,7 °C (pík u směsi s vodou po zmražení se objevil až při teplotě 54,9 °C).

## **7 ZÁVĚR**

### **K pracovnímu úkolu č. 1**

- 1) Z kelímků, jejichž těsnění odolává tlaku 10MPa, voda v předpokládaném teplotním rozsahu neuniká.
- 2) Dobře vyhodnotitelné jsou záznamy fázových přechodů kapalného skupenství vody na led a zpět na kapalinu. Na záznamech není pozorovatelný přechod ze skupenství kapalného na plynné.

### **K pracovnímu úkolu č. 2**

- 1) Rychlost ohřevu vzorku obsahujícího cholesterolsulfát rozpuštěný v tris pufru má na výsledné hodnoty pouze nepatrný vliv.
- 2) Cholesterolsulfát obsažený v tris pufru jen málo ovlivňuje výsledky měření v porovnání se samotným tris puforem.
- 3) Při porovnávání vody a tris pufru během ohřevu bylo  $\Delta H$  u vody o 52 J/g vyšší než u tris pufru. U vody se pík objevil při 8,8°C a u tris pufru při 5,4°C. Při chlazení jsme nemohli zjistit u vody ani u tris pufru  $\Delta H$ .

### **K pracovnímu úkolu č. 3**

- 1) Hmotnostní úbytek epidermis získané ihned po stažení v průběhu sušení je průměrně 43,36%; hmotnostní úbytek epidermis uchovávané při -20°C je průměrně 39,53%.
- 2) Během sycení po předchozím sušení vzrostla hmotnost epidermis získané ihned po stažení o 11,57%; hmotnost epidermis uchovávané při -20°C vzrostla o 8,51%.
- 3) Epidermis uchovávaná při -20°C byla po sycení podrobena dalšímu sušení. Po 21 dnech hmotnost poklesla průměrně o 3,27% vzhledem k hmotnosti, kterou epidermis měla po nasycení.
- 4) Epidermis získaná ihned po stažení byla sycena a po 7 dnech vzrostla její hmotnost průměrně o 58,18%. Po sycení byla tato epidermis sušena, hmotnost poklesla průměrně o 38,92% (tzn. ponechala si část vody).
- 5) V průběhu sušení stratum corneum byl hmotnostní úbytek průměrně 64,43%.
- 6) Během sycení po předchozím sušení vzrostla hmotnost stratum corneum průměrně o 51,26%.
- 7) V průběhu sycení nevysušeného stratum corneum činil hmotnostní přírůstek průměrně 66,56%.

- 8) Při sušení po předchozím sycení klesla hmotnost stratum corneum průměrně o 61,13%.

#### **K pracovnímu úkolu č. 4**

- 1) Voda nemá vliv na počet píků na DSC záznamu.
- 2) U směsi cetylalkohol + cera alba a cetylalkohol + cera alba + voda se první píky objevily téměř při shodných teplotách a druhý pík u směsi s vodou byl pozorovatelný až při teplotě o 6,9°C vyšší, než kdy se objevil pík u směsi bez vody.
- 3) U směsi cetylalkohol + cera alba + voda a cetylalkohol + cera alba + voda po zmražení se první píky objevily téměř při shodných teplotách a druhý pík u směsi s vodou po zmražení se objevil až při teplotě, která je o 6,7°C vyšší, než je teplota směsi s vodou bez předchozího mražení.

## **8 LITERATURA**

- 1) Čihák, R.: *Anatomie* 3, 1. vydání, Praha, Grada Publishing spol.s.r.o., 1997, 559, 560, 563, 564, 570, 571
- 2) Trojan, S. a kol.: *Lékařská fyziologie*, 4. vydání, přepracované a doplněné, Praha, Grada Publishing a.s., 2003, 418-422, 485-486
- 3) Gopinathan, K.: *Advanced Drug Delivery, Reviews*, 54 (suppl. 1), 2002, S7 – S9
- 4) Vodrážka, Z.: *Biochemie - kniha první*, Praha: Academia, 2002, 21 - 22
- 5) Guildner, L.A., Johnson, D.P. and Jones, F.E.: *J. Res. NBS*, 80A, 1976, 505 – 521
- 6) Wagner, W., Saul, A. and Pruss, A.: *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 23, 1994, 515 – 527
- 7) Levelt Sengers, J.M.H. et al.: *J. Phys Chem. Ref. Data*, 14, 1985, 193 – 207
- 8) Wagner, W., et al.: *ASME J. Eng. Gas Turbines & Power*, 122, 2000, 150 – 182
- 9) Simonetti, O., et al.: *Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscop.*, *Arch. Dermatol. Res.*, 287, 1995, 465-473
- 10) Motolsky, A.G., Downes, A.M., Sweeney, T.M.: *Studies of the epidermal water barrier. Part II.*, Investigations of the chemical nature of the water barrier, *J. Invest. Dermatol.*, 50, 1968, 19 – 26
- 11) Rawlings, A.V. et al.: *The biology effect of glycerol*, *J. Invest. Dermatol.*, 100, 1993, 526 – 530
- 12) Rawlings, A.V. et al.: *Stratum corneum moisturization at the molecular level*, *J. Invest. Dermatol.*, 103, 1994, 731 – 740
- 13) Caspers, P.J. et al.: *In vivo confocal Raman microspectroscopy of skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles*, *J. Invest. Dermatol.*, 116, 2001, 434-442

- 14) Bulgin, J.J., Vinson, L.J.: *The use of differential thermal analysis to study the bound water in stratum corneum membranes*, Biochim. Biophys. Acta, 136, 1967, 551-560
- 15) Graves, C.J., Edwards C., Marks R.: *The effects of protective occlusive sloves on stratum corneum barrier properties*. Contact. Dermatitis, 33, 1995, 183 -187
- 16) Van Duzee, B.F.: *Thermal analysis of human stratum corneum*. J. Invest. Dermatol., 65, 1975, 404 – 408
- 17) Cornwell, P.A. et al.: *Mode of action of terpene penetration enhancers in human skin: differential calorimetry, small – angle X- ray diffraction and enhancer uptake studies*, Int. J. Pharm., 127, 1996, 9 – 26
- 18) Mak, V.M., Potts, R.O., Guy, R.H.: *Does hydration affect intercellular lipid organisation in the stratum corneum?*, Pharm. Res., 8, 1991, 1064 – 1065
- 19) Potts, R.O., Francoeur, L.M.: *Lipid biophysics of water loss through the skin*, Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 87, 1990, 3871 - 3873
- 20) Alfonso, A., Meirelles, N., Tabak, M.: *Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study*, Biochim. Biophys. Acta, 1237, 1995, 6 - 15
- 21) Bouwstra, J.A. et al.: *Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering*, J. Invest. Dermatol., 97, 1991, 1005 - 1012
- 22) Bouwstra, J.A. et al.: *Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study*, Int. J. Pharm., 84, 1992, 205 – 216
- 23) horlen, L., Emilson, A., Forslind, B.: *Stratum corneum swelling. Biophysical and computer assisted quantitative assessments*, Arch. Dermatol. Res., 289, 1997, 506 - 513
- 24) Richter, T. et al.: *Investigation of the swelling of human skin cells in liquid media by tapping mode scanning force microscopy*, Appl. Physics., a 72, 2001, 125 – 128
- 25) Van Hal, D.A. et al.: *Structure of fully hydrated human stratum corneum: a freeze fracture electron microscopy study*, J. Invest. Dermatol., 106, 1996, 89 – 95

- 26) Bommannan, D., Potts, R.O., Guy, R.H.: *Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy*, J. Invest. Dermatol., 95, 1990, 403 - 408
- 27) Resl, V. a kol.: *Měření hydratace kůže*. Čes.-slov. Derm. , 81 no 5, 2006, 298 – 301